



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS



Gelificação a frio de proteínas do soro e fibras de linhaça através da adição de sais de cálcio ou sódio

Kátia Regina Kuhn
Engenheira de Alimentos, 2006

Profª. Drª. Rosiane Lopes da Cunha

Orientadora

Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri
Co-Orientador

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre em
Engenharia de Alimentos.

Campinas, Março de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

K955g Kuhn, Kátia Regina
Gelificação a frio de proteínas do soro e fibras de linhaça através da
adição de sais de cálcio ou sódio / Kátia Regina Kuhn. -- Campinas,
SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Rosiane Lopes da Cunha
Co-orientador: Ângelo Luiz Fazani Cavallieri
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Proteínas do soro de leite. 2. Polissacarídeo da linhaça. 3.
Gelificação a frio. 4. Força iônica. 5. Microestrutura. I. Cunha,
Rosiane Lopes da. II. Cavallieri, Ângelo Luiz Fazani. III.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Cold-set gelation of whey proteins and flaxseed fiber by calcium or sodium
salts addition

Palavras-chave em inglês (Keywords): Whey proteins, Flaxseed gum, Cold gelation, Ionic
strength, Microstructure

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Rosiane Lopes da Cunha

Flávia Maria Netto

Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Data de defesa: 20/03/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha
(ORIENTADORA) – DEA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Flávia Maria Netto
(MEMBRO) – DEPAN/FEA/UNICAMP

Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
(MEMBRO) – ITAL

Profa. Dra. Florencia Cecilia Menegalli
(MEMBRO) – DEA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Katiuchia Pereira Takeuchi
(MEMBRO) – DTA/EAEA/UFG

A meus pais e minha irmã...

A Deus, por iluminar minhas decisões, guiar meus passos e acima de tudo pelos obstáculos vencidos e conquistas alcançadas.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, especialmente ao Departamento de Engenharia de Alimentos, e aos professores e funcionários pela oportunidade de aprendizado e realização deste trabalho.

À FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

À Prof^a. Dr^a. Rosiane Lopes da Cunha agradeço principalmente pela orientação, confiança e amizade. Pelo incentivo, compreensão, apoio e ensinamentos transmitidos.

Ao Ângelo pela co-orientação, paciência, amizade e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a Dr^a. Flávia Maria Netto, Dr^a. Maria Teresa Bertoldo Pacheco, Prof^a Dr^a. Florencia Cecilia Menegalli e Prof^a Dr^a. Katiuchia Pereira Takeuchi, pela atenção, correções, sugestões e contribuições para a melhora deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri (DEPAN/UNICAMP), que gentilmente cedeu o isolado protéico de soro de leite bovino.

Aos meus pais, Erno e Tânia, meus grandes amores, que sempre me compreenderam, incentivaram e que nunca mediram esforços pela minha felicidade. Agradeço pela dedicação de vocês, pelos conselhos sábios, paciência e apoio. Sem vocês, chegar até aqui seria impossível. A vocês dedico o meu amor, minha admiração sincera e meu respeito.

À minha manexxx (preferida) Kelly. Foi muito importante tê-la ao meu lado durante este período, aconselhando, apoiando, incentivando, sempre tentando me deixar um pouco menos estressada, rs. Te amo maninha!!!

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa, Carol, Fabi, Aninha, Rejane, Nilson, Joicinha, Daiane, Raphaela, Bruna, Helena, Vitor, Gui, Dona Ana, Joyce, obrigada pelos

momentos agradáveis de convivência, pelos ensinamentos, paciência e por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da pós e colegas da turma DEA 07, e em especial ao Luiz, Margarita, Hugo, Ricardo, Lorena e Vanessa. Obrigada pela amizade, pelas risadas e pelos bons momentos que passamos juntos.

À Nica e à Jana, amigonas da graduação, que apesar da “distância”, sempre estiveram presentes com palavras amigas, incentivo, e que souberam compreender a minha ausência em alguns momentos. Às minhas grandes amigas de Santa Cruz, Jú, Manu, Carol, Dani, Elisa, Ana, Patsy, Julia, Vanessa, Lú, que mesmo de longe, também sempre estiveram por perto. Obrigada pela amizade sincera!! Amo todas vocês!!

A todos aqueles que sempre estiveram presentes ao meu lado ou em pensamento, e que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho, meu muito obrigada.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMO GERAL.....	xv
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO 1. Introdução e Objetivos	1
1.1) Introdução.....	2
1.2) Objetivos.....	4
CAPÍTULO 2. Revisão Bibliográfica.....	6
2.1) Biopolímeros.....	7
2.1.1) Polissacarídeo da linhaça (“Flaxseed Gum”).....	7
2.1.2) Proteínas do soro de leite bovino	10
2.2) Processo de gelificação a frio	13
2.3) Interações entre proteínas e polissacarídeos.....	19
2.3.1) Géis mistos	21
CAPÍTULO 3. Material e Métodos.....	25
3.1) Material.....	26
3.2) Preparo dos sistemas	27
3.2.1) Extração do polissacarídeo da linhaça (FG).....	27
3.2.2) Preparo das soluções estoque dos biopolímeros	27
3.2.2.1) Solução estoque de isolado protéico de soro (WPI)	27
3.2.2.2) Solução estoque de polissacarídeo da linhaça (FG).....	28
3.2.3) Preparo dos géis de isolado protéico de soro (WPI).....	28
3.2.4) Preparo dos géis bipoliméricos	30
3.2.4.1) Adição direta de sais	30
3.2.4.2) Membranas de diálise	31
3.3) Análises	33
3.3.1) Análises reológicas	33
3.3.1.1) Propriedades mecânicas	33
3.3.1.1.1) Modelo BST.....	34
3.3.1.1.2) Modelo reológico fractal.....	35
3.3.1.2) Ensaios oscilatórios e em estado estacionário	36
3.3.1.2.1) Curvas de escoamento.....	36
3.3.1.2.2) Ensaios oscilatórios.....	37

3.3.1.3) Viscosidade intrínseca	37
3.3.1.3.1) Estimativa da massa molecular	38
3.3.2) Microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	39
3.3.2.1) Avaliação da dimensão fractal (D_f) por análise de imagem SEM.....	40
3.3.3) Microscopia de fluorescência	40
3.3.4) Capacidade de retenção de água (WHC).....	41
3.3.5) Determinação de cor.....	41
3.3.6) Análise estatística	42
CAPÍTULO 4. Resultados e Discussão.....	43
4.1) Ensaios reológicos em cisalhamento	44
4.1.1) Curvas de escoamento	44
4.1.2) Ensaios oscilatórios	46
4.2) Viscosidade intrínseca	51
4.3) Análise visual.....	57
4.4) Determinação de cor.....	58
4.5) Propriedades mecânicas.....	61
4.5.1) Modelagem do comportamento não-linear sob compressão utilizando a Equação de BST.....	65
4.6) Capacidade de retenção de água (WHC)	68
4.7) Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	70
4.8) Avaliação da estrutura fractal dos géis de WPI.....	72
4.8.1) Determinação da dimensão fractal (D_f) através de um modelo mecânico	72
4.8.2) Determinação da dimensão fractal (D_f) através da análise de imagem SEM..	74
4.8.3) Comparação dos valores de D_f obtidos em função das propriedades elásticas e da SEM	76
4.9) Estudo de separação de fases.....	80
4.10) Construção de diagrama de fases	83
4.11) Géis bipoliméricos.....	85
4.11.1) Adição direta de sais.....	86
4.11.1.1) Análise visual	86
4.11.1.2) Propriedades mecânicas	86
4.11.2) Membranas de diálise	90
4.11.2.1) Análise visual	90
4.11.2.2) Propriedades mecânicas	92

4.11.2.3) Capacidade de retenção de água (WHC)	96
4.11.2.4) Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	98
4.11.2.4.1) Avaliação da dimensão fractal (D_f) por análise de imagem SEM ..	101
CAPÍTULO 5. Conclusões Gerais	105
CAPÍTULO 6. Referências Bibliográficas	108
ANEXO 1. Estudo da condição ótima de extração do polissacarídeo da linhaça. Validação da razão de precipitação etanol:extrato, temperatura de extração e razão de diluição água:semente	117

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição de monossacarídeos (fração mássica e molar, %) das frações neutras (FN) e aniônicas (FA) da mucilagem da linhaça.	8
Tabela 2.2. Características físicas das principais proteínas do soro.	11
Tabela 2.3. Classificação das interações na formação do gel de proteína.	15
Tabela 3.1. Composição do isolado protéico de soro (WPI) e do polissacarídeo da linhaça (FG) em relação ao teor de proteína, umidade, cinzas, lipídeos, carboidratos e minerais.	26
Tabela 4.1. Efeito da temperatura do ensaio no índice de consistência (k), índice de comportamento (n) e viscosidade (η_{100}) a 100 s^{-1} da solução de FG (2% m/m) sem a adição de sais.	45
Tabela 4.2. Valores dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') das amostras de FG (2% m/m) sem e com a adição de sais de cálcio ($\mu = 150$) em cada etapa do ensaio de varredura de temperatura.....	47
Tabela 4.3. Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) de cruze de G' e G'' das amostras de FG (2% m/m) sem e com a adição de sais de cálcio ($\mu = 150$) em cada etapa do ensaio.....	50
Tabela 4.4. Valores de viscosidade intrínseca $[\eta]$ da FG disperso em diferentes solventes a 10°C	53
Tabela 4.5. Quantidade de proteína da solução inicial e das fases superior e inferior dos sistemas.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema da conversão de proteínas nativas em uma rede protéica de acordo com o processo de indução térmica e/ou de gelificação a frio.....	14
Figura 2.2. Mecanismo de formação de géis filamentosos e particulados de proteínas do soro através da adição de sais de cálcio.....	17
Figura 2.3. Esquema de misturas de biopolímeros e tipos de interações possíveis.	20
Figura 2.4. Representação esquemática da rede de um gel coloidal	24
Figura 3.1. Fluxograma de extração do polissacarídeo da linhaça (FG).....	27
Figura 3.2. Representação esquemática das análises realizadas com o polissacarídeo da linhaça (FG).	28
Figura 3.3. Fluxograma do método de preparo dos géis de isolado protéico de soro (WPI).	30
Figura 3.4. Fluxograma do método de preparo dos géis bipoliméricos (WPI – FG) através da adição direta de sais (A) e da difusão de sais utilizando membranas de diálise (B).	32
Figura 3.5. Representação esquemática da deformação normal (H_t) e radial (R_t) de uma amostra sob compressão uniaxial.	35
Figura 4.1. Curvas de escoamento (A, B) e viscosidade aparente (C) da solução de FG (2% m/m) sem a adição de sais a 10°C (A) e a 25°C (B).	44
Figura 4.2. Variação do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') com a frequência da solução de FG (2% m/m) sem a adição de sais a 10°C e tensão de 0,5 Pa.	46
Figura 4.3. Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') durante o aquecimento das amostras de FG (2% m/m) sem e com a adição de sais ($\mu = 150$).	48
Figura 4.4. Módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') durante o resfriamento das amostras de FG (2% m/m) sem e com a adição de sais ($\mu = 150$).	48
Figura 4.5. Equação de Huggins para FG em (A) água, (B) NaCl (150 mM) e (C) CaCl_2 (50 mM).	52
Figura 4.6. Géis de WPI formados a frio através da adição de sais. (A) 7% WPI- CaCl_2 , (B) 7% WPI-NaCl e (C) 5% WPI-NaCl não auto-sustentável.....	58
Figura 4.7. Parâmetros de luminosidade (L^*) (A) e de cromaticidade (a^* e b^*) (B e C) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 ou NaCl utilizando membranas de diálise.	59

Figura 4.8. Propriedades mecânicas dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 ou NaCl utilizando membranas de diálise. (A) Tensão na ruptura (σ_R) e (B) Deformação na ruptura (ϵ_R).	62
Figura 4.9. Módulo de elasticidade (E) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 ou NaCl utilizando membranas de diálise.	64
Figura 4.10. Valores preditos e experimentais de tensão-deformação de géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de (A) CaCl_2 ou (B) NaCl em membranas de diálise nas concentrações de WPI 5%, 6%, 7%, 8% e 9% (m/m).	66
Figura 4.11. Parâmetro não-linear obtido da Equação de BST (η) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 ou NaCl utilizando membranas de diálise.	67
Figura 4.12. Capacidade de retenção de água (WHC) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 ou NaCl utilizando membranas de diálise.	69
Figura 4.13. Micrografias SEM dos géis de WPI formados a frio pela difusão de sais de CaCl_2 ou NaCl utilizando membranas de diálise.	71
Figura 4.14. Curvas tensão (σ)-deformação (ϵ_H) para os géis de WPI formados a frio, em diferentes concentrações, através da difusão de sais de (A) CaCl_2 ou (B) NaCl em membranas de diálise.	72
Figura 4.15. Limite de linearidade (γ_0) e módulo de elasticidade (E) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de (A, C) CaCl_2 ou (B, D) NaCl em membranas de diálise em função da concentração de proteína.	74
Figura 4.16. Micrografia SEM (A) e correspondente imagem binária (B) do gel de WPI (5% m/m) formado a frio pela difusão de CaCl_2 em membrana de diálise.	75
Figura 4.17. Dimensão fractal (D_f) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 ou NaCl utilizando membranas de diálise.	75
Figura 4.18. Aspecto visual dos sistemas formados por soluções de WPI (7% m/m)–FG (0,4% m/m) sem a adição de sais após (A) 0 horas, (B) 24 horas e (C) 72 horas de armazenamento.	80
Figura 4.19. Microestrutura por fluorescência dos sistemas WPI (7% m/m)–FG (0,4% m/m). (A) Solução inicial, (B) fase superior e (C) fase inferior.	82
Figura 4.20. Diagrama visual de fases para os géis WPI – FG formados a frio pela adição direta de sais de (A) CaCl_2 ou (B) NaCl	84
Figura 4.21. Géis WPI – FG formados a frio através da adição direta de sais. (A) 8%WPI-0,5%FG – CaCl_2 e (B) 8%WPI-0,3%FG – NaCl	86

Figura 4.22. Propriedades mecânicas dos géis WPI – FG formados a frio através da adição direta de sais de CaCl_2 ou NaCl . (A) Tensão na ruptura (σ_R), (B) Deformação na ruptura (ϵ_R) e (C) Módulo de elasticidade (E).	87
Figura 4.23. Géis WPI – FG formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 (A, B e C) e NaCl (D, E e F) utilizando membranas de diálise. (A, D) 8% WPI-0,1% FG, (B, E) 8% WPI-0,3% FG e (C, F) 8% WPI-0,5% FG.	90
Figura 4.24. Propriedades mecânicas dos géis WPI – FG formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 ou NaCl utilizando membranas de diálise. (A) Tensão na ruptura (σ_R), (B) Deformação na ruptura (ϵ_R) e (C) Módulo de elasticidade (E).	93
Figura 4.25. Capacidade de retenção de água (WHC) dos géis WPI – FG formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 ou NaCl utilizando membranas de diálise.....	97
Figura 4.26. Micrografias SEM dos géis WPI – FG formados a frio pela difusão de sais de CaCl_2 ou NaCl utilizando membranas de diálise, nas fases superior e inferior.....	100
Figura 4.27. Dimensão fractal (D_f) dos géis WPI – FG formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 (A) ou NaCl (B) utilizando membranas de diálise, nas fases superior (C) e inferior (D).....	102

Dissertação de Mestrado

AUTORA: Kátia Regina Kuhn

TÍTULO: Gelificação a frio de proteínas do soro e fibras de linhaça através da adição de sais de cálcio ou sódio

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Rosiane Lopes da Cunha

CO-ORIENTADOR: Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri

Departamento de Engenharia de Alimentos – FEA – UNICAMP

RESUMO GERAL

Biopolímeros, como as proteínas e os polissacarídeos, são utilizados pela indústria de alimentos por desempenharem um papel essencial na estrutura, textura e estabilidade dos produtos. O entendimento das interações biopoliméricas é importante para melhorar suas propriedades funcionais, como por exemplo, a capacidade de gelificação, e para o desenvolvimento de novos produtos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo estudar as interações macromoleculares de sistemas contendo proteínas do soro de leite (WPI) e/ou polissacarídeo da linhaça (FG) em sistemas gelificados a frio pela adição de sais de cálcio ou sódio, buscando correlacionar estas interações com as propriedades mecânicas e de estrutura dos géis formados. Inicialmente realizou-se a caracterização reológica do polissacarídeo da linhaça e foi observado um comportamento de fluido pseudoplástico e propriedades de gel fraco. Com a adição de sais, verificou-se uma redução na viscosidade intrínseca e nos módulos elástico e viscoso das soluções. Em uma segunda etapa, foram estudados géis puros de WPI (5, 6, 7, 8 e 9% m/m) formados pela difusão de sais de cálcio ou sódio através de membranas de diálise e observou-se a formação de estruturas opaca e translúcida, sendo que o aumento na concentração de WPI levou a uma diminuição na claridade e porosidade dos géis e a um aumento na rigidez, elasticidade e capacidade de retenção de água, em ambos os sistemas (CaCl_2 e

NaCl). Os géis de WPI formados pela difusão de sais de cálcio apresentaram-se mais rígidos e elásticos, menos deformáveis e com menor capacidade de retenção de água em relação aos géis de sódio. Por último, foram estudados sistemas mistos WPI (8% m/m) – FG (0,1; 0,3 e 0,5% m/m) utilizando dois procedimentos para incorporação de sais, a difusão através de membranas de diálise e a adição direta, e observou-se que o método de preparo dos géis levou a sistemas com propriedades mecânicas bastante distintas. No método de difusão lenta de sais, visualizou-se a formação de géis heterogêneos (separação de fases macroscópica). Nestes sistemas, o aumento na concentração de FG levou a diminuição da rigidez, deformabilidade e da capacidade de retenção de água dos géis como consequência da incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros e descontinuidade da estrutura da rede do gel. No entanto, foi no método de adição direta de sais de sódio que obteve-se os géis bipoliméricos mais fortes, sendo este método o mais indicado visando melhor estrutura e propriedades mecânicas dos géis formados com maior viabilidade de uso em escala industrial.

Master Degree Thesis

AUTHOR: Kátia Regina Kuhn

TITLE: Cold-set gelation of whey proteins and flaxseed fiber by calcium or sodium salts addition

SUPERVISOR: Prof^a. Dr^a. Rosiane Lopes da Cunha

CO-SUPERVISOR: Dr. Ângelo Luiz Fazani Cavallieri

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING – FEA – UNICAMP

ABSTRACT

Biopolymers, such as proteins and polysaccharides, are used by the food industry for playing an essential role in the structure, texture and stability of the products. An understanding of the biopolymers interactions is important for improvement of their functional properties, such as gelation, and for the new products development. Thus, the aim of this work it was to study macromolecular interactions between whey protein isolate (WPI) and/or flaxseed gum (FG) at cold-set gels formed by calcium or sodium salts addition, by correlation of these interactions with the mechanical properties and structure of the formed gels. Initially, flaxseed gum rheological characterization was realized and it was observed a shear thinning behavior and “weak gel” properties. Salts addition led to a decrease in intrinsic viscosity and in the storage and loss modulus of solutions. In a second step of this work, pure WPI gels (5, 6, 7, 8 and 9% w/w) formed by calcium or sodium salts diffusion through dialysis membranes were studied and it was observed the formation of structures opaque and translucent, where the increase WPI concentration led to a decrease in the clarity and porosity of the gels and to an increase in hardness, elasticity and water-holding capacity, in both systems (CaCl_2 and NaCl). WPI gels formed by calcium salts diffusion were harder and more elastic, less deformable and with lesser ability to hold water in relation to sodium gels. Finally, mixed WPI (8% w/w) – FG (0.1, 0.3

and 0.5% w/w) systems using two procedures for incorporation of salts were studied, the diffusion through dialysis membranes and the direct addition, and it was observed that the gels preparation method led to systems with quite different mechanical properties. By slow salts diffusion, it was observed the heterogeneous gels formation (macroscopic phase separation). In these systems, the increase FG concentration led to a decrease of the hardness, deformability and water-holding capacity of the gels as a consequence of the thermodynamic incompatibility between biopolymers and gel network discontinuity. However, it was by sodium salts direct addition that it were obtained stronger bi-polymeric gels, being this the most appropriate method to better structure and mechanical properties of the formed gels with higher viability for use in industrial scale.

CAPÍTULO 1. Introdução e Objetivos

1.1) Introdução

A indústria de alimentos tem intensificado e diversificado suas linhas de produção com o objetivo de atender às exigências de consumidores de adquirir produtos que ofereçam uma ótima relação entre qualidade e benefícios à saúde. Em particular, o setor de laticínios tem investido esforços neste sentido, trazendo ao mercado um maior número de produtos com alto valor agregado, como por exemplo, iogurtes e sobremesas lácteas enriquecidos com fibras, vitaminas, cálcio ou ferro e queijos com reduzido teor de gordura. Além de saborosos, saudáveis e naturais, os consumidores procuram por alimentos com ótimas características de textura. Sendo assim, a indústria procura constantemente desenvolver e oferecer ingredientes que melhorem as propriedades funcionais dos alimentos (Bryant & McClements, 1998), tais como, consistência, capacidade de gelificação e retenção de água. Produtos alimentícios com texturas diferenciadas podem ser obtidos a partir da mistura de diferentes ingredientes, especialmente os de alta massa molecular, como as proteínas e os polissacarídeos (Dickinson, 1998).

Dentre os polissacarídeos utilizados na formulação de alimentos, as fibras apresentam algumas vantagens, como o fato de não serem digeridas pelas enzimas do organismo humano (Slavin, 2005) e, portanto, não conferirem incremento calórico. A goma de linhaça tem atraído muito a atenção, principalmente, devido à suposição de que suas fibras solúveis sejam benéficas à saúde, podendo reduzir o risco de diabetes e hipercolesterolemia (Goh et al., 2006). É um hetero-polissacarídeo com características mistas (aniônico e neutro), dependendo da variedade e condições de obtenção (Izydorczyk et al., 2005). Esta goma também apresenta potencial como ingrediente alimentício por mostrar boa capacidade de retenção de água e exibir formação de géis termorreversíveis (Chen et al., 2007; Chen et al., 2006a), além de ser capaz de interagir com outros biopolímeros.

As proteínas do leite são ingredientes muito valorizados devido as suas excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais. Elas apresentam excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais. Além disso, possuem também excepcionais propriedades funcionais de solubilidade, formação e estabilidade de espuma, capacidade emulsificante, gelificante e podem ser utilizadas na formação de filmes e cápsulas protetoras, sendo recomendadas como ingrediente seguro (GRAS) (Sgarbieri, 2005; Bryant & McClements, 1998; Morr & Ha, 1993).

A gelificação de uma solução de proteínas globulares pode ser induzida de diversas formas, sendo a mais comum, a gelificação térmica que é o processo mais estudado por ser responsável pela estrutura presente em muitos alimentos. Os géis térmicos são formados em uma única etapa, onde ocorrem de maneira simultânea a desnaturação protéica e a agregação, que resultam na formação do gel (Totousaus et al., 2002). A gelificação a frio de proteínas globulares é um método relativamente novo que apresenta algumas vantagens em relação à gelificação térmica, tais como, formação de géis em baixas concentrações de proteína e à temperatura ambiente. Isto possibilita a adição de componentes termolábeis ao sistema, como vitaminas e outros compostos nutracêuticos. A gelificação a frio consiste em duas etapas, sendo que na primeira ocorre a formação de agregados de proteínas desnaturadas pelo aquecimento em baixas concentrações, baixa força iônica e em pH acima ou abaixo do ponto isoelétrico. Na segunda etapa, ocorre a gelificação dos agregados causada pela diminuição da repulsão eletrostática, através da alteração do pH ou pelo aumento da concentração de sais (Bryant & McClements, 1998).

A microestrutura dos géis está diretamente relacionada com as características de textura, e estas dependem do tamanho e forma dos agregados formados na etapa de agregação (Alting et al., 2003a; Ju & Kilara, 1998a,b). Uma vez que as características

estruturais dos agregados protéicos estão associados às condições de temperatura e formulação empregadas no processamento, a textura desses alimentos dependerá de fatores como, concentração inicial de proteína, temperatura e tempo de aquecimento, tipo de agente gelificante (sais ou ácidos), ordem de adição desses agentes entre as etapas da gelificação a frio ou adição de outros compostos macromoleculares, como os polissacarídeos.

O processo de gelificação a frio de proteínas do soro com a adição de polissacarídeos ainda foi pouco estudado. Alguns destes trabalhos estão relacionados ao estudo do efeito da adição de diversos polissacarídeos de diferentes cargas superficiais (neutros e aniônicos) (De Jong & Van de Velde, 2007), como a xantana (Cavallieri, 2007; Bryant & McClements, 2000a) ou guar (Cavallieri, 2007) no processo de gelificação a frio de proteínas do soro, induzido por NaCl ou glucona- δ -lactona. Porém, com relação ao estudo da interação entre as proteínas do soro e a goma de linhaça não foram encontrados estudos na literatura, apesar da potencial importância desta fibra na produção de alimentos saudáveis.

1.2) Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi estudar as interações macromoleculares de sistemas contendo proteínas do soro de leite e/ou polissacarídeo da linhaça em sistemas gelificados a frio através da modificação da força iônica do meio com a adição de cloreto de cálcio ou sódio, buscando correlacionar estas interações com as propriedades mecânicas e de estrutura dos géis.

De forma a atender este objetivo geral, o trabalho foi realizado em etapas, de acordo com os seguintes objetivos específicos:

1 – Avaliação das propriedades do polissacarídeo da linhaça, sendo realizado:

a) Extração e caracterização química e física;

b) Caracterização das propriedades reológicas através de ensaios reológicos em estado estacionário (curvas de escoamento) sem a adição de sais;

c) Estudo da transição sol – gel através de ensaios reológicos em baixas deformações sem e com a adição de sais de cálcio.

2 – Estudo do efeito da adição de sais de cálcio ou sódio diretamente ou por difusão através de membranas de diálise na formação e propriedades de géis:

a) puros de proteínas do soro;

b) mistos de proteínas do soro e polissacarídeo da linhaça.

Estes géis auto-sustentáveis foram avaliados quanto às propriedades mecânicas em compressão uniaxial, capacidade de retenção de água, determinação de cor e microestrutura.

CAPÍTULO 2. Revisão Bibliográfica

2.1) Biopolímeros

2.1.1) Polissacarídeo da linhaça (“Flaxseed Gum”)

O linho (*Linum usitatissimum* L.) é um dos mais antigos cultivares conhecidos pelo homem, principalmente pelo uso do seu óleo e fibras (Chen et al., 2006a). A sua semente é oval, tem dimensões aproximadas de 2,5 mm X 5 mm X 1 mm e uma massa média de 3-13 mg por semente (Wanasundara & Shahidi, 1996). A semente de linho (linhaça) contém aproximadamente 35% de lipídios constituído de ácidos graxos poliinsaturados, do tipo ômega 3 (cerca de 57%) e ômega 6, 30% de proteínas e 35% de fibras, sendo que 7-10% destas são fibras solúveis, cuja composição varia em função do cultivar e localização geográfica (Goh et al., 2006).

A goma de mucilagem é um polissacarídeo muito viscoso, obtido a partir do material da parede secundária na camada mais externa da semente de linho. Com a hidratação das sementes, esta camada se expande e a mucilagem é liberada na superfície (Izydorczyk et al., 2005). A mucilagem corresponde a aproximadamente 8 – 9% da massa de semente, porém seu rendimento depende do processo de extração (Chen et al., 2006a; Fedeniuk & Biliaderis, 1994), e pode variar de 3,5 a 9,4% (Oomah et al., 1995).

A mucilagem da linhaça contém de 50 a 80% de carboidratos, de 4 a 20% de proteínas e de 3 a 9% de cinzas (Izydorczyk et al., 2005), sendo que contém mais sais minerais e proteínas do que a maior parte das gomas comerciais, como os polissacarídeos neutros jataí (LBG) e a guar (Mazza & Biliaderis, 1989). A porção de carboidratos é constituída de uma mistura de polissacarídeos neutros, principalmente resíduos de xilose, arabinose e galactose e de polissacarídeos ácidos, contendo resíduos de galactose, ramnose, e ácido galacturônico (Izydorczyk et al., 2005; Warrand et al., 2003) (Tabela 2.1). A fração neutra da mucilagem da linhaça contém uma cadeia principal de resíduos de (1-4) β -D-xilopiranosil com cadeias laterais contendo arabinose e galactose ligadas no O-2 e/ou no O-3. A fração ácida é composta de uma cadeia principal

de ramnagalacturonana com resíduos de (1-4) α -D-galacturanopiranosil e (1-2) α -L-ramnopiranosil. As cadeias laterais contêm resíduos de L-fucose e D-galactose.

Tabela 2.1. Composição de monossacarídeos (fração mássica e molar, %) das frações neutras (FN) e aniônicas (FA) da mucilagem da linhaça. Fonte: Warrand et al., 2003.

Monossacarídeo	FN (75%)		FA (25%)			
	Fração Mássica	Fração Molar	FA ₁ (15%)		FA ₂ (85%)	
			Fração Mássica	Fração Molar	Fração Mássica	Fração Molar
D-Xilose	59	62,0	6	7,0	3	3,5
D-Galactose	16	12,7	25	24,3	23	22,2
D-Arabinose	12	12,7	n.q.*	n.q.*	2	2,3
L-Fucose	7	6,6	12	12,8	7	7,4
L-Ramnose	4	3,1	28	29,8	39	41,3
D-Ácido Galacturônico	3	2,3	29	26,0	26	23,3

* Presença de traços, não foi quantificado.

A fração neutra (75%) é composta principalmente de arabinoxilanas de alta massa molecular ($M_w = 1,16.10^6$ Da) e exibe comportamento pseudoplástico em altas concentrações. A fração ácida (25%) consiste em duas frações de ramnagalacturonanas, semelhante à pectina, de menores massas moleculares ($M_w = 6,5.10^5$ Da e $M_w = 1,7.10^4$ Da) que exibem comportamento newtoniano em concentrações de até 2,0% (Warrand et al., 2003; Stewart & Mazza, 2000; Cui et al., 1994a).

Há pelo menos duas décadas pesquisadores têm tentado purificar e caracterizar a mucilagem da linhaça. Extrações aquosas são os métodos mais comuns, sendo que a temperatura, a razão água:semente e o pH do meio de extração exercem influência significativa no rendimento, na pureza e nas propriedades funcionais da goma (Stewart & Mazza, 2000; Cui et al., 1994b). Utilizando a metodologia de superfície de resposta, foram encontradas condições ótimas para o processo de extração aquosa da goma de linhaça,

sendo a temperatura de 85-90°C, pH 6,5-7,0 e a razão água:semente de 13,0 (Cui et al., 1994b).

O polissacarídeo da linhaça tem valor nutricional como fibra alimentar e desempenha um papel importante na redução dos riscos de diabetes e doenças cardíacas coronárias, prevenindo o câncer de cólon e reto e a incidência de obesidade (Oomah & Mazza, 1999). É um hidrocolóide com boa capacidade de retenção de água, semelhante à goma guar (Wang et al., 2008; Goh et al., 2006), e apresenta alta viscosidade em solução aquosa (Chen et al., 2006a). Sua viscosidade é influenciada pela concentração, pH, força iônica e temperatura. Em concentrações entre 0,05 e 0,2%, as curvas de escoamento da goma de linhaça (pH 6,5 e 25°C) tendem a apresentar comportamento newtoniano, enquanto que em concentrações acima de 0,2%, as soluções apresentam comportamento pseudoplástico, o que é típico de soluções poliméricas (Stewart & Mazza, 2000). A goma de linhaça também exibe propriedades de gel fraco, sendo sua fração neutra a principal responsável por este comportamento (Izydorczyk et al., 2005; Cui et al., 1994a). Funcionalmente, a goma de linhaça é muito semelhante à goma arábica, devido a sua elevada solubilidade e capacidade de estabilizar espumas, sendo sugerida para substituí-la em emulsões como estabilizante (Chen et al., 2006a; Goh et al., 2006; Wanasundara & Shahidi, 1996; Fedeniuk & Biliaderis, 1994; Mazza & Biliaderis, 1989).

A temperatura de dissolução da goma tem um forte efeito sobre a força do gel da goma de linhaça. Neste caso, o aumento da temperatura leva a um aumento do raio hidrodinâmico devido à maior hidratação e extensão das moléculas, acarretando em maior interação molecular e aumento do número de zonas de junção. Da mesma forma, a força do gel da goma de linhaça também aumenta com a concentração do polissacarídeo, devido ao aumento do número de moléculas presentes. Uma máxima força do gel pode ser obtida entre pHs 6-9, dado que em menores valores de pH há uma diminuição da

repulsão eletrostática e da interação entre as moléculas enquanto que, em valores de pH mais altos há uma despolimerização alcalina que resulta em uma menor quantidade de zonas de junção (Chen et al., 2006a).

Já existem na literatura alguns estudos relacionados à interação da goma de linhaça com outros biopolímeros (Wang et al., 2008; Chen et al., 2006a). Entre eles está o estudo de Wang et al. (2008) que avaliou a influência da concentração de goma de linhaça e da temperatura sobre as propriedades reológicas das misturas goma de linhaça – amido de milho. Os autores observaram que o aumento na concentração de goma de linhaça resultou em um aumento na viscosidade aparente das misturas, o que poderia ser atribuído à interação entre as moléculas dos biopolímeros. Os módulos elástico (G') e viscoso (G'') das misturas goma de linhaça – amido de milho apresentaram-se bem superiores aos valores dos géis de amido de milho, visto que a adição de goma de linhaça ajudou a formar géis mais fortes.

2.1.2) Proteínas do soro de leite bovino

O soro de leite bovino, fluido resultante da fabricação de queijos, consiste em uma complexa mistura de proteínas globulares, lactose, lipídios e minerais, em meio aquoso (Lopes et al., 2006). Ingredientes a base de proteínas do soro podem ser adquiridos de diferentes formas, sendo que as mais comuns são os isolados protéicos de soro (WPI) e concentrados protéicos de soro (WPC). O WPI tem maior concentração de proteínas (>90%) do que o WPC (50 – 75% de proteínas) (Bryant & McClements, 1998).

As principais frações protéicas do soro são a β -lactoglobulina (β -Lg), a α -lactoalbumina (α -La), a albumina bovina sérica (BSA) e as imunoglobulinas (Ig) (Lizarraga et al., 2006). Na Tabela 2.2, estão apresentadas algumas das propriedades das principais frações das proteínas do soro.

Tabela 2.2. Características físicas das principais proteínas do soro. Fonte: Bryant & McClements, 1998; Morr & Ha, 1993.

Proteína	Ponto Isoelétrico (pI)	Massa Molecular (kDa)	Concentração em relação ao teor total de proteínas (%)	T_d (°C)
β-lactoglobulina	5,2	18,4	60	78
α-lactoalbumina	4,2-4,5	14,2	22	62
Albumina Bovina Sérica	4,7-4,9	66	5,5	64
Imunoglobulinas	5,5-8,3	150-960	9,1	72

T_d representa a temperatura de desnaturação.

A β-Lactoglobulina (β-Lg) é uma proteína globular, que contém 162 resíduos de aminoácidos com um grupo tiol e duas ligações dissulfídicas (Damodaran, 1997). A sua estrutura compacta tridimensional é composta de cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos voltadas para o interior, enquanto cadeias laterais polares estão voltadas para o exterior (Bertrand & Turgeon, 2007). Ela é desnaturada termicamente quando aquecida por 30 minutos a temperaturas superiores a 60°C. A 95°C se verifica completa desnaturação, com extensa transformação conformacional e a exposição de áreas hidrofóbicas e grupos nucleofílicos (-SH: ε-NH⁺₃) altamente reativos (Havea et al., 2001). A β-Lg apresenta alta solubilidade em uma ampla faixa de pH, mas é particularmente elevada em baixos valores de pH (>97%, pH 3,0) (Chatterton et al., 2006).

A α-Lactoalbumina (α-La) é uma proteína globular compacta que possui um excelente perfil de aminoácidos essenciais, sendo rica em lisina, leucina, treonina, triptofano e cistina. Ela apresenta também 4 ligações dissulfídicas unindo os resíduos de aminoácidos (Kinsella & Whitehead, 1989). Em temperaturas próximas a 65°C e pH 6,7 a α-La é desnaturada, porém de 80 a 90% da desnaturação é revertida após o resfriamento. Esta elevada capacidade de renaturação é responsável pela alta resistência térmica

atribuída à α -La (Morr & Ha, 1993). A α -La é capaz de ligar-se a íons como cálcio e zinco, sendo que o cálcio dá a ela estabilidade contra a desnaturação térmica irreversível (Kinsella & Whitehead, 1989).

A albumina bovina sérica (BSA) é uma proteína globular que consiste de uma cadeia polipeptídica contendo aproximadamente 580 resíduos de aminoácidos com 17 ligações dissulfídicas intramoleculares e um grupo tiol livre no resíduo 34 (N-terminal) (Kinsella & Whitehead, 1989). A BSA é solúvel em água destilada a 3°C em níveis acima de 35%, porém precipita na faixa de temperatura de 40 a 45°C. Existem evidências de que entre 40 e 50°C ela se desdobra parcialmente, expondo grupos apolares na superfície molecular, facilitando as interações proteína-proteína (Morr & Ha, 1993).

As imunoglobulinas (Ig) referem-se a um conjunto de glicoproteínas (Morr & Ha, 1993) que se apresentam como polímeros ou monômeros de uma unidade básica composta de quatro cadeias polipeptídicas unidas através de ligações dissulfídicas (Kinsella & Whitehead, 1989). Estas proteínas exibem uma maior temperatura de desnaturação (desdobramento) do que a α -La e a β -Lg, mas na presença de outras proteínas do soro, como a β -Lg e a BSA, elas são extremamente termolábeis, o que pode ser devido à interação entre elas via ligações dissulfídicas (Morr & Ha, 1993).

As proteínas do soro apresentam diferentes propriedades funcionais, como boa solubilidade, capacidade emulsificante, espumante, gelificante, as quais dependem de vários fatores, como: pH, tipo e concentração de solutos iônicos, temperatura, bem como a presença de outros componentes, como açúcares e polissacarídeos (Morr & Ha, 1993). A desnaturação térmica é o meio mais utilizado para a ocorrência da gelificação das proteínas do soro, que é uma de suas propriedades funcionais mais importantes (Li et al., 2006).

2.2) Processo de gelificação a frio

Uma técnica que tem sido recentemente desenvolvida para produzir ingredientes de proteínas do soro que sejam capazes de formar géis a temperatura ambiente ou sob resfriamento é a chamada “gelificação a frio”. Estes ingredientes podem ser utilizados para produzir alimentos com diferentes texturas, aparências e capacidades de retenção de água (Bryant & McClements, 1998).

A formação dos géis de proteínas globulares pode ser dividida em diferentes etapas, sendo elas: desnaturação, agregação e gelificação, sendo que no caso da gelificação térmica, estas ocorrem de maneira praticamente simultânea (Figura 2.1). Na gelificação a frio, as etapas de desnaturação e agregação ocorrem separadamente da etapa de gelificação propriamente dita. Neste processo, primeiramente, são formados agregados de proteínas solúveis desnaturadas através do aquecimento de uma solução de proteínas nativas em pH diferente do ponto isoelétrico, em baixa força iônica e com uma concentração de proteínas menor do que a necessária para a gelificação térmica. Nestas condições, não ocorre a gelificação do sistema devido ao predomínio da repulsão eletrostática entre os agregados formados no aquecimento (Alting et al., 2003b), e mesmo com o resfriamento da solução, estes agregados permanecem solúveis e não ocorre a formação de gel. A gelificação pode ser posteriormente induzida a temperatura ambiente por mudanças na qualidade do solvente (Figura 2.1), como a variação de pH ou adição de sais (Alting, 2003c; Alting et al., 2000).

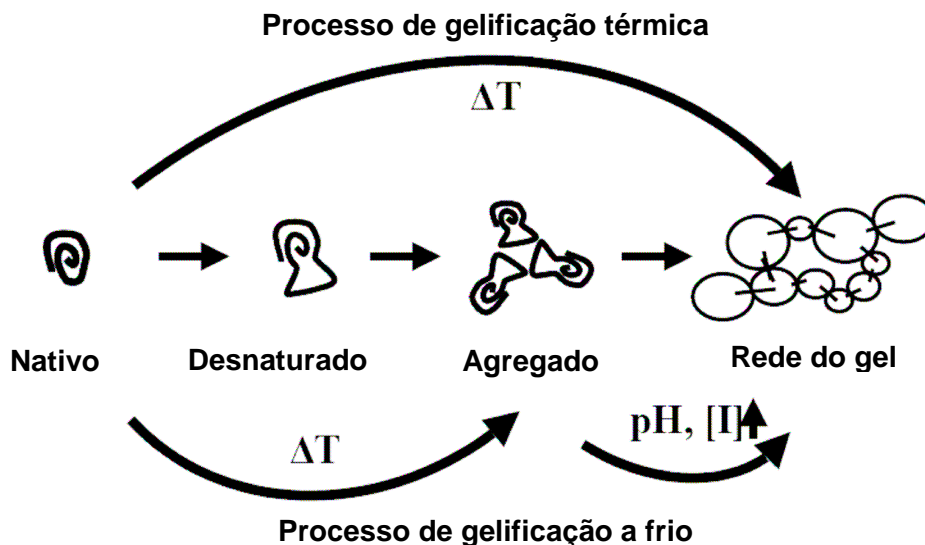


Figura 2.1. Esquema da conversão de proteínas nativas em uma rede protéica de acordo com o processo de indução térmica e/ou de gelificação a frio. Fonte: Alting, 2003c.

A formação de géis a frio abre oportunidades para as proteínas como transportadoras de compostos nutraceuticos sensíveis e no desenvolvimento de novos alimentos funcionais. Uma vantagem desta relação é a exposição de vários grupos funcionais com a desnaturação da proteína, podendo criar diferentes interações entre os compostos nutraceuticos e as cadeias polipeptídicas, tais como (i) ligações de hidrogênio, (ii) interações hidrofóbicas e (iii) interações eletrostáticas, sendo assim interessante para aplicação em sistemas com liberação controlada (Chen et al., 2006b). As interações proteína-proteína e proteína-solvente são influenciadas por fatores que afetam a gelificação, bem como as propriedades dos géis. Estes fatores podem ser classificados como intrínsecos e extrínsecos, conforme apresentado na Tabela 2.3 (Totosaus et al., 2002).

Tabela 2.3. Classificação das interações na formação do gel de proteína. Fonte: Totosa et al., 2002.

Fatores Intrínsecos	Fatores Extrínsecos
Hidrofobicidade	Concentração de proteína
Interações eletrostáticas	pH
Ligações dissulfeto	Temperatura
Massa molecular	Força iônica e tipo de íon
Composição aminoacídica	Pressão

A variação dos fatores extrínsecos pode afetar o processo de formação do gel, estrutura da rede, propriedades reológicas e a capacidade de retenção de água do gel formado, conforme descrito a seguir (Totosa et al., 2002; Bryant & McClements, 1998):

Tipo e concentração de sal: a força iônica tem um efeito significativo na absorção de água, inchamento e solubilidade das proteínas e na microestrutura do gel formado. A adição de sais mono e divalentes evita a repulsão eletrostática entre os filamentos carregados eletricamente, contribuindo para a sua agregação;

pH: a gelificação a frio de uma solução de proteína desnaturada termicamente poderia ser induzida pela alteração do pH para valores em torno do ponto isoelétrico das proteínas, causando a redução da repulsão eletrostática entre os filamentos e levando à agregação;

Concentração de proteína: este é um fator importante na determinação do tipo de gel e nas suas características finais, principalmente em relação à textura. As interações entre as macromoléculas necessárias para que ocorra a gelificação protéica são proporcionais à concentração de proteína. Em baixas concentrações de proteína, a tendência é a formação de uma solução viscosa, porém com o aumento da concentração, a viscosidade da solução aumenta e acima de um determinado valor, ocorre a formação de gel. A concentração crítica de proteína necessária para a formação de géis a frio é menor do que a necessária para a formação de géis térmicos. A resistência à compressão

e deformabilidade do gel formado são altamente dependentes da concentração de proteína;

Temperatura: a temperatura na qual o processo de gelificação é realizado tem uma importante influência na taxa de gelificação, nos tipos de interação e, portanto, na estrutura dos géis formados. Por isso acredita-se, que ela apresenta um importante papel na determinação da taxa de agregação dos filamentos de proteína, pois com o aumento da temperatura, os grupos hidrofóbicos ficam expostos e interagem mais entre si. Apesar disso, uma vez que os géis tenham sido formados, sua resistência à compressão tende a aumentar com a diminuição da temperatura. No processo de gelificação a frio, a etapa de desnaturação da proteína por aquecimento, é essencial para expor os grupos reativos, necessários para formação da estrutura tridimensional do gel (Hongsprabhas & Barbut, 1998; Bryant & McClements, 1998; Alting, 2003c).

A concentração de sal usada na gelificação a frio é um dos principais fatores que determinam a estrutura e organização espacial dos agregados de proteína (Bryant & McClements, 2000b). Baixas concentrações de sal produzem géis filamentosos, enquanto que em altas concentrações são formadas estruturas particuladas (Chen et al., 2006b; Hongsprabhas & Barbut, 1997b; Barbut, 1995b; McClements & Keogh, 1995; Barbut & Foegeding, 1993). Os filamentos são consequência da agregação linear das unidades estruturais que são mantidas por interações hidrofóbicas e a forma particulada é produzida pela agregação aleatória, essencialmente controlada pelas forças de van der Waals (Chen et al., 2006b; Remondetto & Subirade, 2003) (Figura 2.2).

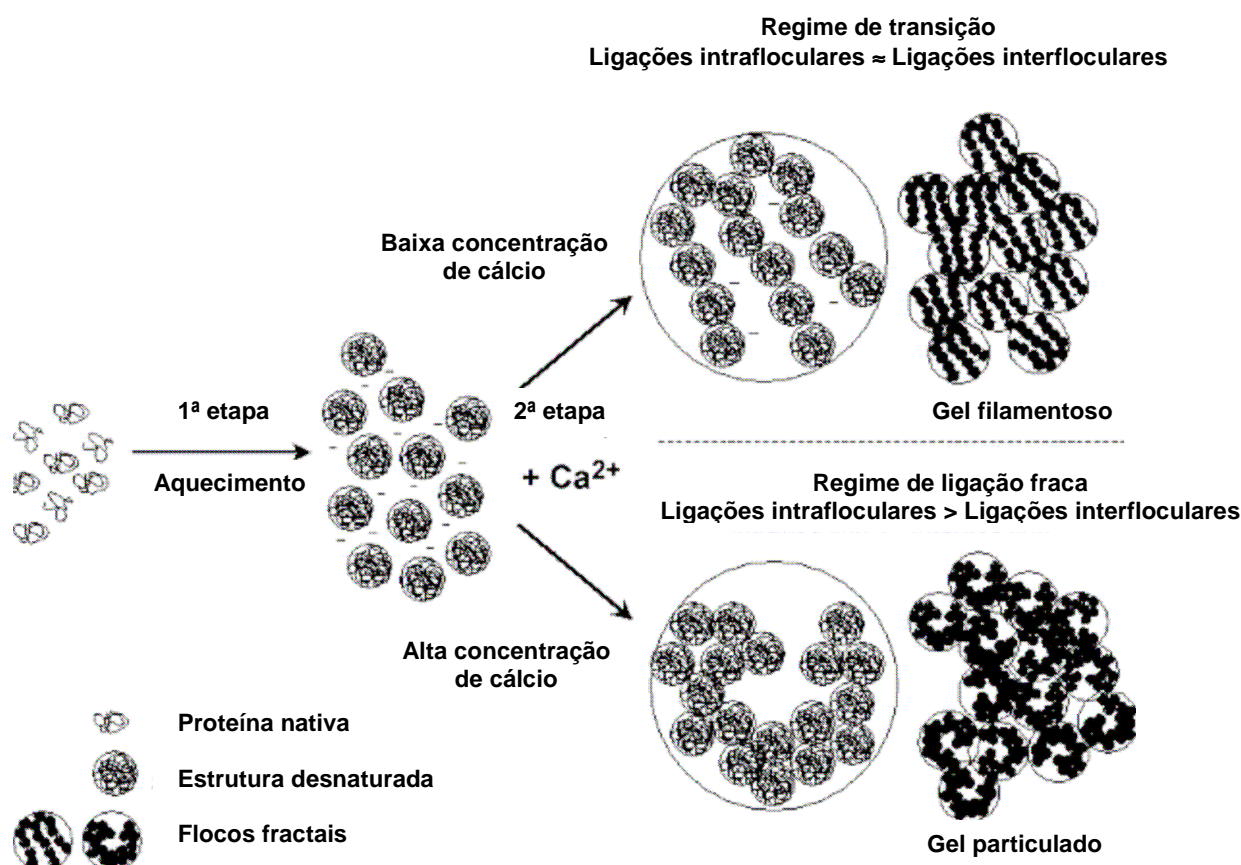


Figura 2.2. Mecanismo de formação de géis filamentosos e particulados de proteínas do soro através da adição de sais de cálcio. Fonte: Maltais et al., 2008.

Alguns estudos mostram que o aumento na concentração de sais (NaCl ou CaCl_2) para promover a formação do gel a frio pode causar um aumento na rigidez e na opacidade e uma redução na capacidade de retenção de água (WHC) dos géis formados, este último devido ao aumento do tamanho dos poros da rede (Bryant & McClements, 1998; Ju & Kilara, 1998b; Hongsprabhas & Barbut, 1997b; Roff & Foegeding, 1996; Barbut, 1995a,b; Barbut & Foegeding, 1993). Bryant & McClements (2000b), em estudo sobre a influência do NaCl e do CaCl_2 na gelificação a frio do isolado protéico de soro (WPI), mostraram que o aumento na concentração de sais, resultou em uma maior taxa de gelificação, com conseqüente aumento da turbidez e rigidez da estrutura do gel. Os géis com adição de CaCl_2 apresentaram-se mais rígidos que os géis com NaCl , fato

atribuído à sua capacidade de diminuir a repulsão eletrostática e habilidade de formar pontes entre os agregados de proteína com carga negativa (Vardhanabhuti et al., 2001).

Maiores temperaturas de desnaturação (Hongsprabhas & Barbut, 1996) e de gelificação (Hongsprabhas & Barbut, 1997a), maiores tempos de aquecimento (Barbut & Foegeding, 1993) ou aumento na concentração de proteína da solução inicial (Ju & Kilara, 1998a) levam a uma alteração nas propriedades dos géis de proteínas do soro formados a frio, sugerindo que estas também estão diretamente relacionadas às características dos agregados protéicos formados na etapa de aquecimento.

Ju & Kilara (1998a) estudaram o efeito do tratamento térmico em diferentes concentrações de WPI (1-9%) sobre o tamanho dos agregados e rigidez do gel formado. Estes autores observaram que o aumento da concentração de proteína levou a um aumento no tamanho, na quantidade de agregados e na rigidez do gel. Barbut & Foegeding (1993), ao compararem géis térmicos com géis a frio formados pela adição de sais de cálcio, na mesma força iônica, encontraram diferentes propriedades. Géis induzidos por cálcio apresentaram uma estrutura mais ordenada e menos opaca, enquanto que os géis induzidos termicamente exibiram uma estrutura particulada e opaca. Além disso, eles avaliaram o efeito da relação tempo/temperatura de desnaturação e verificaram que quanto maior esta relação, maior é a rigidez do gel, sendo o gel a frio o mais rígido. Hongsprabhas & Barbut (1996), ao estudarem o efeito combinado da adição de CaCl_2 (10-120 mM) e da temperatura de desnaturação (70, 80 ou 90°C) na gelificação a frio de WPI, observaram um aumento na opacidade do gel com o aumento na concentração de sal nas três temperaturas estudadas. Com relação à temperatura de desnaturação, os autores verificaram que suspensões submetidas a menores temperaturas (70°C/30 min) resultaram em géis opacos, enquanto que maiores temperaturas (90°C) formaram géis translúcidos após a adição de CaCl_2 . Além disso, os

géis formados a partir das suspensões aquecidas a 70°C exibiram menor capacidade de retenção de água e rigidez quando comparados aos desnaturados a 90°C.

Hongsprabhas & Barbut (1997a) avaliaram o efeito combinado da temperatura de gelificação (1, 11 ou 24°C) e concentrações de CaCl_2 (10-120 mM) na gelificação a frio de isolado protéico do soro (WPI). Baixas temperaturas de gelificação resultaram na formação de géis translúcidos. Com exceção dos géis produzidos a 1°C com 10 mM, uma menor temperatura de gelificação, levou ao aumento da força necessária para fraturar os géis. De acordo com os autores, os resultados sugeriram que as características dos géis podem ser modificadas não somente pelo controle das condições utilizadas durante a etapa de desnaturação da proteína (aquecimento prévio), mas também na etapa de formação do gel (temperatura de gelificação e concentração de CaCl_2), separadamente.

2.3) Interações entre proteínas e polissacarídeos

As interações entre dois biopolímeros de diferente natureza podem ser do tipo associativas ou segregativas, resultando em três possíveis situações de equilíbrio (Figura 2.3):

1. Incompatibilidade: ocorre a segregação dos biopolímeros com a formação de duas fases aquosas imiscíveis, sendo cada uma delas rica em um dos biopolímeros;

2. Coacervação complexa: existe atração entre os diferentes biopolímeros resultando na formação de duas fases aquosas distintas, sendo uma delas rica nos dois biopolímeros e a outra formada predominantemente pelo solvente;

3. Miscibilidade: a interação entre dois biopolímeros diferentes é similar à interação entre hidrocolóides de uma mesma espécie, ou seja, o sistema permanece homogêneo, não existindo separação de fases (Syrbe et al., 1998).

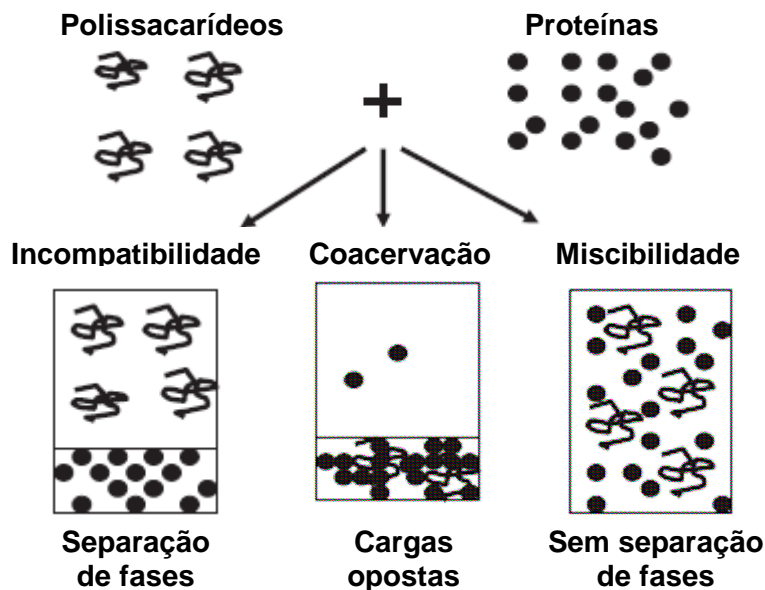


Figura 2.3. Esquema de misturas de biopolímeros e tipos de interações possíveis. Fonte: Ye, 2008.

Na separação de fases do tipo segregativa, existe uma forte repulsão entre dois diferentes tipos de biopolímeros, ou seja, há uma alta energia livre (desfavorável) na mistura. Esta separação de fases ocorre quando apenas um ou ambos os biopolímeros não possuem carga ou no caso dos dois apresentarem a mesma carga (McClements, 2006). A incompatibilidade termodinâmica entre eles pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como o tipo de moléculas biopoliméricas envolvidas (massa molecular, densidade de carga, concentração, conformação) e a composição do meio (pH e força iônica) (Ye, 2008; McClements, 2006). Em relação à concentração de biopolímeros, em altas concentrações, o sistema apresenta uma competição entre as macromoléculas (Ye, 2008), que é o chamado efeito de exclusão de volume. Este pode estar associado ao aparecimento de interações repulsivas entre os biopolímeros (Tolstoguzov, 2003), visto que o volume ocupado por uma macromolécula não está acessível para as outras. Quanto ao pH e à força iônica, tem-se um aumento da auto-associação das moléculas de proteínas conforme o pH se aproxima do pI das proteínas, ou então na presença de altas

concentrações de sais, resultando na incompatibilidade entre proteínas e polissacarídeos (Grinberg & Tolstoguzov, 1997). Nas maiores concentrações de sal, existe uma diminuição da solubilidade protéica (“salting out”) devido a uma competição entre a proteína e os íons de sal pelas moléculas de água, resultando na auto-associação das proteínas (Cheftel et al., 1996).

2.3.1) Géis mistos

Em alimentos, as interações freqüentemente conduzem à formação de um complexo proteína/polissacarídeo ou à incompatibilidade termodinâmica (Li et al., 2006).

Quando a mistura de proteínas e polissacarídeos é feita em condições de pH acima do ponto isoelétrico da proteína, geralmente ocorre a separação de fases, sendo cada fase enriquecida com um dos polímeros e o solvente dividido entre as duas fases (Pérez et al., 2006). No entanto, quando soluções mistas de proteínas e polissacarídeos são aquecidas, ocorre uma competição entre o processo de gelificação e a separação de fases. Uma vez que ocorre a gelificação, a estrutura básica do gel é estabelecida e a separação é retardada. Uma maneira de controlar esta competição é retardar ou acelerar a cinética de gelificação através da modificação das variáveis que têm efeito sobre este processo, como, o pH e a taxa de aquecimento. Neste caso, haverá variados níveis de competição entre a gelificação e a separação de fases, o que levará à criação de variadas estruturas com diversificadas propriedades reológicas e estruturais (Li et al., 2006).

Muitos exemplos de géis mistos de polissacarídeos/proteínas do soro, formados termicamente, são encontrados na literatura. Estes exemplos citam tanto a utilização de proteínas do soro comerciais (Tavares et al., 2005) como frações individuais, tais como a β -Lg (Olsson et al., 2000). No entanto, até o presente momento, não foram encontrados na literatura estudos sobre as interações das proteínas do soro com a goma de linhaça. Porém, Chen et al. (2007) estudaram os efeitos da adição de goma de linhaça sobre a

temperatura de desnaturação térmica das proteínas da carne (principalmente miosina), textura e propriedades reológicas. A textura, sinerese e as características visuais de géis de proteínas da carne modificaram significativamente devido a adição de goma de linhaça e as proteínas da carne tiveram sua temperatura de desnaturação aumentada na presença da goma (2% m/m), o que indicou a interação proteína-polissacarídeo.

Em contraste ao processo de gelificação térmica de proteínas do soro, a gelificação induzida a frio é um processo ainda pouco estudado com a adição de polissacarídeos. Porém, já existem alguns trabalhos que abordam as propriedades da gelificação a frio de sistemas mistos proteína/polissacarídeo. Estudo realizado para avaliar a microestrutura e propriedades reológicas de géis de proteínas do soro formados a frio utilizando glucona- δ -lactona (GDL) mostrou que a adição de polissacarídeos ao sistema protéico levou a uma modificação e a um aumento da complexidade da relação estrutura – reologia (Cavallieri, 2007). Esta relação foi função do tipo de polissacarídeo (aniônico ou neutro), sua concentração, das condições de acidificação e do pH final. Géis produzidos em menores taxas de acidificação mostraram uma estrutura mais descontínua, mais fraca e rede menos elástica, a qual foi atribuída ao predomínio da separação de fases devido à cinética de gelificação mais lenta. Em contraste, a gelificação em taxas de acidificação maiores foi predominante, favorecendo a formação de estruturas menos porosas, as quais resultaram em géis mais fortes e mais elásticos. De Jong & Van de Velde (2007) avaliaram o efeito da adição de diversos polissacarídeos de diferentes cargas superficiais (neutros e aniônicos) na gelificação a frio de proteínas do soro. Neste estudo, os sistemas foram acidificados com uma quantidade de glucona- δ -lactona (GDL) necessária para atingir o pH final fixo em 4,8 após 20 horas de armazenamento na temperatura ambiente. Segundo os autores, nas condições de gelificação empregadas, a carga dos polissacarídeos foi o fator dominante na microseparação de fases dos géis, e o segundo fator foi a polidispersão e rigidez da cadeia

molecular dos polissacarídeos. Além disso, demonstraram que a micro-separação de fases e a conseqüente estrutura obtida influenciaram significativamente nas propriedades mecânicas dos sistemas mistos. O processo de gelificação a frio de proteínas do soro com a adição de xantana induzido pela adição de NaCl foi estudado por Bryant & McClements (2000a). Na presença de sal, a xantana causou um aumento na taxa de gelificação, na elasticidade e na densidade óptica do sistema.

De maneira a realizar uma correlação quantitativa, as microestruturas podem ser avaliadas por análise de imagem determinando-se os parâmetros de dimensão fractal e lacunaridade (Cavallieri, 2007). A análise fractal é um método analítico quantitativo para caracterizar formas e estruturas irregulares (Mandelbrot, 1983), tipicamente encontradas na microestrutura de géis coloidais, como os de proteínas globulares. Estes géis são considerados como aglomerados de partículas que apresentam um elevado grau de auto-similaridade em uma determinada escala de observação, maior do que o tamanho da partícula fundamental, conforme pode ser visualizado na Figura 2.4. Em sistemas protéicos puros, a análise fractal tem sido bastante utilizada e explorada na literatura (Dávila & Parés, 2007; Hagiwara et al., 1998; Hagiwara et al., 1997a; Hagiwara et al., 1997b). Com este intuito, relações de escala foram utilizadas para a correlação entre o aumento exponencial da elasticidade da rede em função da concentração protéica (Shih et al., 1990; Wu & Morbidelli, 2001). No entanto, estudos da agregação fractal de sistemas binários proteína-polissacarídeo ainda não foram encontrados. Este fato pode estar associado à dificuldade de utilizar relações de escala uma vez que a adição de polissacarídeos ao sistema protéico pode levar a uma alteração significativa da rede do gel devido a um aumento da porosidade da microestrutura como conseqüência dos fenômenos simultâneos de gelificação e separação de fases durante a fase de acidificação (De Jong & Van de Velde, 2007; Sanchez et al., 2000).

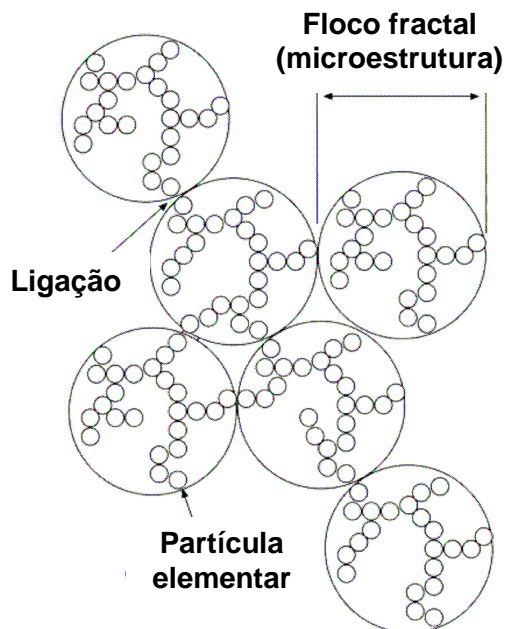


Figura 2.4. Representação esquemática da rede de um gel coloidal mostrando diferentes níveis de estrutura em função da escala. O agregado primário se aglomera em conjuntos maiores formando a rede do gel. O empacotamento destas partículas fundamentais leva à formação de uma estrutura de natureza fractal (auto-similar em função da escala de observação do sistema). Fonte: Marangoni et al., 2000.

CAPÍTULO 3. Material e Métodos

3.1) Material

Para a composição dos sistemas utilizou-se isolado protéico de soro de leite bovino (WPI) (ALACEN 895, New Zealand Milk Products, Nova Zelândia) gentilmente cedido pelo Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri (DEPAN/UNICAMP). O polissacarídeo (FG) foi extraído de sementes de linho adquiridas no comércio local (Sabor da Terra Agro Indústria Ltda, Bragança Paulista, SP), cujas composições estão apresentadas na Tabela 3.1. Os sais de NaCl e CaCl₂ utilizados foram de grau analítico (Nuclear, SP).

Tabela 3.1. Composição do isolado protéico de soro (WPI) e do polissacarídeo da linhaça (FG) em relação ao teor de proteína, umidade, cinzas, lipídeos, carboidratos e minerais.

	WPI	FG
Teor de proteína (%) ⁽¹⁾	93,14 ± 0,08 (N x 6,38)	9,65 ± 0,13 (N x 6,25)
Umidade (%BU) ⁽²⁾	3,26 ± 0,03	4,19 ± 0,12
Cinzas (%) ⁽²⁾	1,51 ± 0,02	5,39 ± 0,10
Lipídeos (%) ⁽³⁾	0,55 ± 0,08	0,13 ± 0,02
Carboidratos (%)	0,6 ± 0,05 ⁽⁴⁾	80,64 ⁽⁵⁾
Na ⁺ (%) ⁽⁶⁾	0,53 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Ca ⁺² (%) ⁽⁶⁾	0,10 ± 0,00	0,45 ± 0,02
K ⁺ (%) ⁽⁶⁾	0,10 ± 0,00	2,67 ± 0,04

⁽¹⁾ Teor de nitrogênio determinado pelo Método de Kjeldahl (AOAC, 1997). Fator de conversão para proteínas lácteas = 6,38 e para alimentos em geral = 6,25.

⁽²⁾ Determinação por gravimetria (AOAC, 1997).

⁽³⁾ Determinação segundo o Método de Bligh & Dyer (Bligh & Dyer, 1959).

⁽⁴⁾ Teor de lactose. Determinação segundo o Método Fenol-Sulfúrico (Hodge & Hofreiter, 1962).

⁽⁵⁾ Determinação por diferença.

⁽⁶⁾ Quantificação por Espectrometria de Absorção Atômica (Instituto de Química – Unicamp).

3.2) Preparo dos sistemas

3.2.1) Extração do polissacarídeo da linhaça (FG)

A extração do polissacarídeo da linhaça (Figura 3.1) foi realizada de acordo com metodologia adaptada de Cui et al. (1994b). O estudo da validação das condições ótimas de extração aquosa encontra-se no Anexo 1.

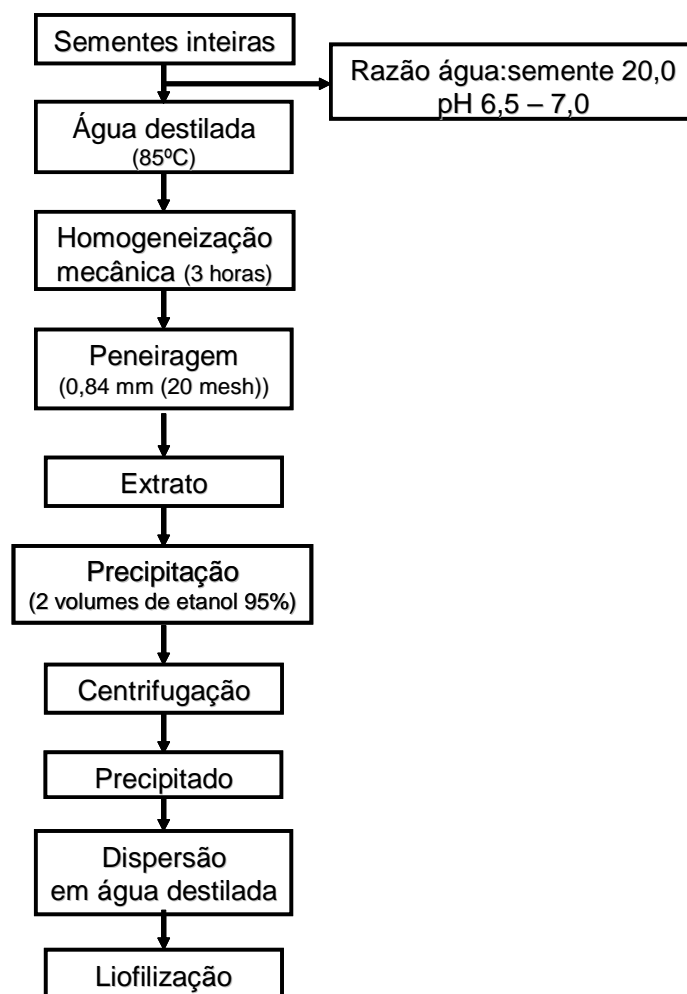


Figura 3.1. Fluxograma de extração do polissacarídeo da linhaça (FG).

3.2.2) Preparo das soluções estoque dos biopolímeros

3.2.2.1) Solução estoque de isolado protéico de soro (WPI)

A solução estoque de isolado protéico de soro foi preparada (10% m/m) por dissolução do pó em água destilada deionizada (pH 6,7) sob agitação magnética por 90

minutos a temperatura ambiente (25°C). A solução foi então mantida durante 12 horas a 10°C para promover completa solubilização da proteína.

3.2.2.2) Solução estoque de polissacarídeo da linhaça (FG)

Ensaio preliminares de aquecimento (90°C/30 min) do polissacarídeo da linhaça foram realizados com o intuito de se trabalhar com a goma a quente. Porém, com o aquecimento ela apresentou-se mais viscosa dificultando o seu manuseio, e então optou-se por trabalhar com a goma a frio. A solução estoque do polissacarídeo da linhaça foi preparada na concentração de 2% (m/m) em água deionizada sob forte agitação mecânica por 120 minutos a temperatura ambiente (25°C). Esta solução foi então mantida a 10°C por um período de 12 horas para promover completa solubilização. No fluxograma (Figura 3.2) estão apresentadas as análises que foram realizadas na solução estoque de FG (2% m/m) sem e com a adição de sais de cálcio ($\mu = 150$).

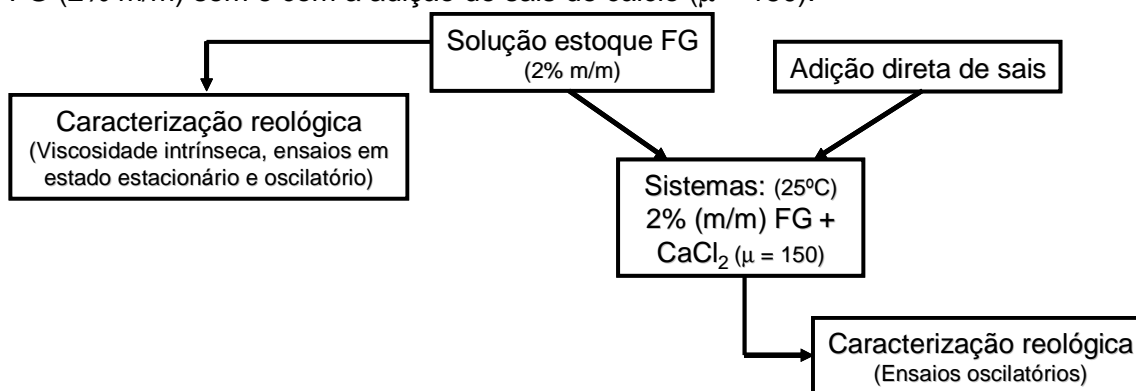


Figura 3.2. Representação esquemática das análises realizadas com o polissacarídeo da linhaça (FG).

3.2.3) Preparo dos géis de isolado protéico de soro (WPI)

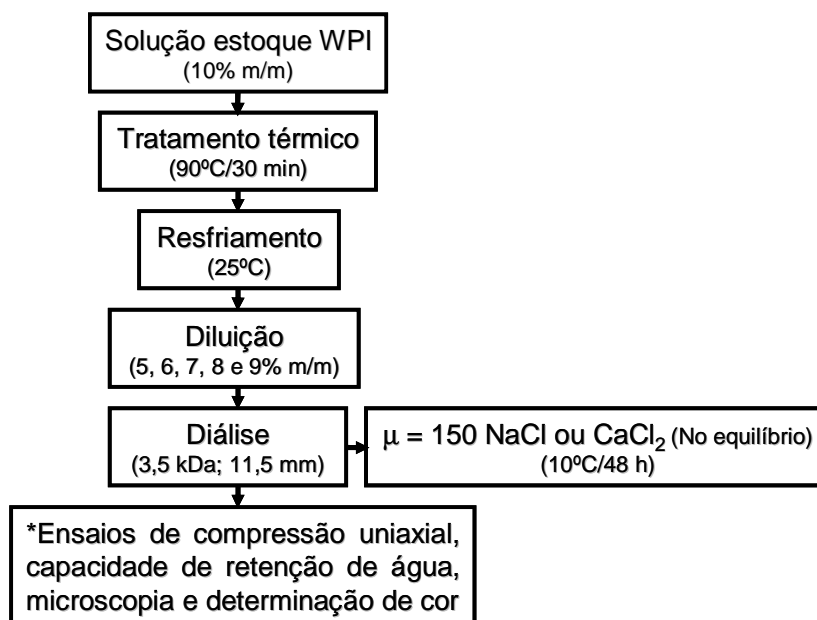
Foram realizados ensaios preliminares de preparo dos géis de WPI (3, 5 e 7% m/m) formados a frio pela adição direta de sais, seguida da homogeneização em agitador magnético, porém observou-se a formação de pequenos grumos de proteína após a adição dos sais, e em alguns casos, ocorreu até a gelificação instantânea. Portanto,

optou-se por realizar a gelificação a frio das proteínas do soro pela difusão de sais utilizando membranas de diálise.

A solução estoque de WPI (10% m/m) foi previamente desnaturada (90°C/30 min) em um béquer encamisado com circulação externa de água quente e leve agitação magnética e então, foi rapidamente resfriada até temperatura ambiente (25°C) em banho de gelo. A solução estoque de WPI foi então diluída com água deionizada até as concentrações de 5, 6, 7, 8 e 9% (m/m) a 25°C e estas, foram transferidas para membranas de diálise (Spectra/Por # 7, massa molecular de corte de 3,5 kDa, 11,5 mm diâmetro, Spectropor, Los Angeles, EUA). As membranas foram mergulhadas em solução salina e armazenadas a 10°C para promover a diálise por um período de 48 horas (Barbut & Foegeding, 1993). Para o preparo das soluções salinas (NaCl e CaCl₂), adicionou-se os sais em concentrações que resultaram em sistemas com $\mu = 150$ no equilíbrio (gel + solução salina), sendo que as concentrações adicionadas foram calculadas a partir da Equação 1.

$$\mu = \frac{1}{2} \sum C_i \cdot Z_i^2 \quad (1)$$

onde μ corresponde à força iônica, C_i é a concentração dos íons no sistema e Z_i é a carga dos íons. Com isso, a solução de NaCl foi preparada em maior concentração (153,15 mM) do que a solução de CaCl₂ (51,05 mM) para que $\mu = 150$ fosse alcançada em todos os sistemas. A Figura 3.3 apresenta o fluxograma do método de preparo dos géis de WPI e das análises realizadas.



* Os resultados obtidos nos ensaios de compressão uniaxial foram avaliados de acordo com o Modelo BST e o Modelo reológico fractal. As microscopias foram avaliadas em relação à dimensão fractal (D_f) através da análise de imagem SEM.

Figura 3.3. Fluxograma do método de preparo dos géis de isolado protéico de soro (WPI).

3.2.4) Preparo dos géis bipoliméricos

Primeiramente foi realizada uma avaliação da interação entre as proteínas do soro e o polissacarídeo da linhaça sem a adição de sais, em que observou-se uma separação de fases visual e microscópica (Microscopia de Fluorescência). Em seguida, os géis bipoliméricos foram preparados conforme descrito a seguir:

3.2.4.1) Adição direta de sais

A solução estoque de FG (2% m/m) foi misturada em agitador magnético a temperatura ambiente (25°C) durante 5 minutos juntamente com os sais (150 mM de NaCl ou 50 mM CaCl₂). Em seguida, a solução estoque de WPI (10% m/m) desnaturada foi adicionada lentamente e o sistema foi mantido durante 30 minutos sob agitação magnética para garantir completa homogeneização. Após, as amostras foram acondicionadas a 10°C em recipientes cilíndricos de 21 mm de diâmetro e 21 mm de altura por 48 horas para a formação e estabilização da rede dos géis. Foram preparados

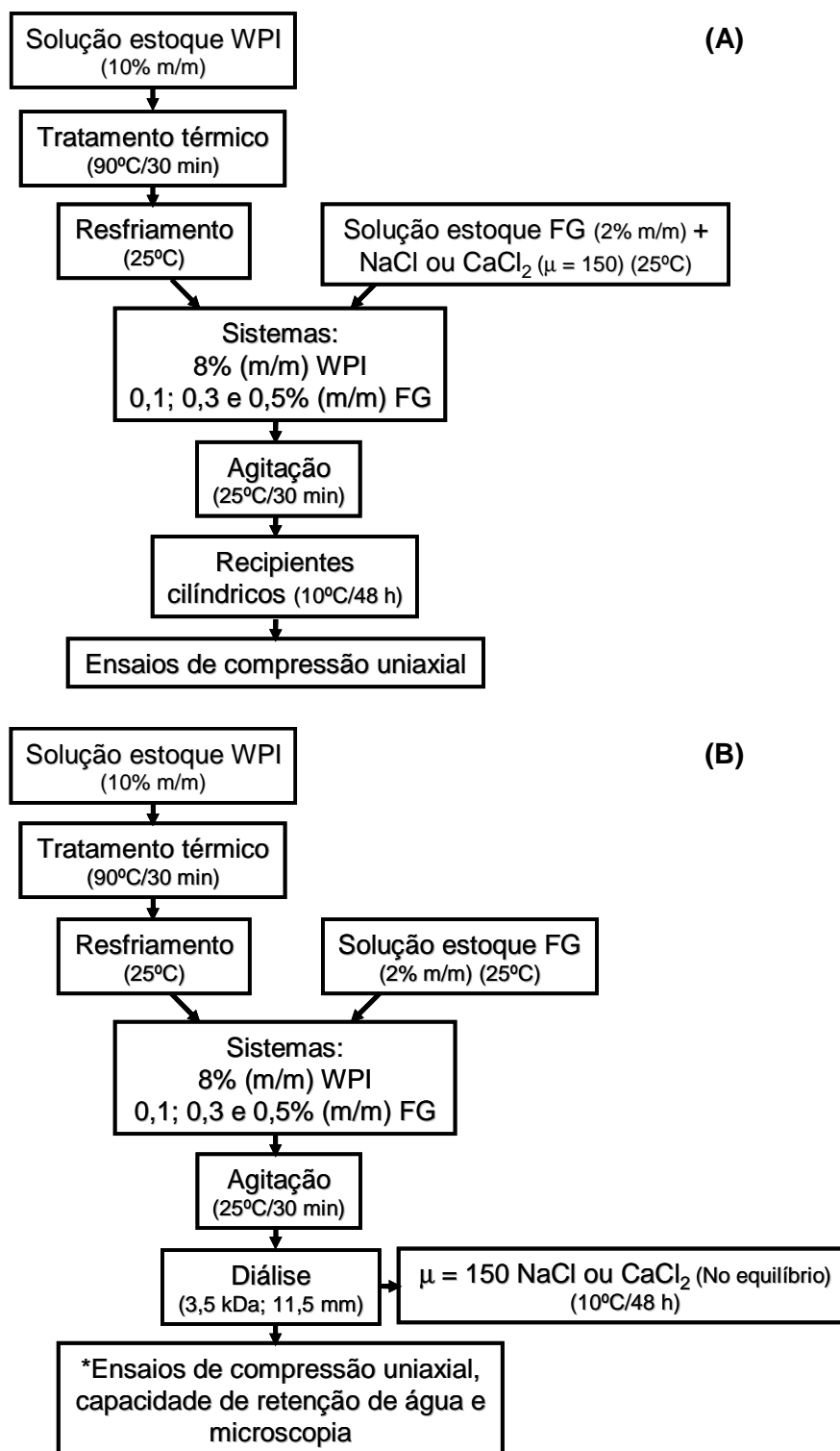
sistemas contendo concentração variada de polissacarídeo (0,1; 0,3 e 0,5% m/m) e de proteína (1 a 8% m/m) para a construção de um diagrama de fases visual. O diagrama foi construído para descrever as interações entre cada par de biopolímeros, sendo que foi possível observar os seguintes comportamentos: região monofásica gelificada, região monofásica com gel não auto-sustentável (não manteve a forma quando removido dos recipientes cilíndricos), região monofásica não gelificada (líquida), região de 2 fases com gel não auto-sustentável e região de 2 fases não gelificada.

A partir do diagrama de fases, foram determinadas as concentrações de biopolímeros a serem utilizadas nos ensaios de gelificação bipolimérica com adição direta de sais e através da difusão de sais em membranas de diálise. A gelificação a frio através da adição direta de sais foi realizada em diferentes concentrações de polissacarídeo (0,1; 0,3 e 0,5% m/m) e fixa de proteína (8% m/m), sendo que o procedimento de preparo dos géis foi o mesmo descrito acima para a construção do diagrama de fases.

3.2.4.2) Membranas de diálise

A solução estoque de WPI (10% m/m) desnaturada termicamente foi adicionada à solução estoque de FG (2% m/m), ambos nas quantidades determinadas para obter-se as concentrações finais desejadas. O sistema foi mantido sob agitação magnética a 25°C durante 30 minutos para garantir completa homogeneização. Em seguida, as soluções foram transferidas para membranas de diálise e realizou-se o mesmo procedimento descrito no item 3.2.3. Foram preparados sistemas contendo diferentes concentrações de polissacarídeo (0,1; 0,3 e 0,5% m/m) e fixa de proteína (8% m/m).

Os géis bipoliméricos foram preparados por rápida (adição direta) ou lenta (diálise) difusão dos sais, conforme descrito nos fluxogramas mostrados na Figura 3.4 (A e B, respectivamente), juntamente com as análises realizadas nos géis.



* As microscopias foram avaliadas em relação à dimensão fractal (D_f) através da análise de imagem SEM.

Figura 3.4. Fluxograma do método de preparo dos géis bipoliméricos (WPI – FG) através da adição direta de sais (A) e da difusão de sais utilizando membranas de diálise (B).

3.3) Análises

3.3.1) Análises reológicas

3.3.1.1) Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos géis obtidos foram avaliadas através de ensaios de compressão uniaxial até a deformação de 80% de sua altura inicial, sob velocidade de compressão de 1 mm/s. Foi utilizado um texturômetro TA-XT-Plus Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd., Surrey, Inglaterra) equipado com uma célula de carga de 25 kg.

Nos ensaios foram utilizadas placas cilíndricas de acrílico com 40 mm de diâmetro (géis em membranas de diálise) e 60 mm de diâmetro (géis em recipientes cilíndricos), lubrificadas com óleo de silicone de baixa viscosidade de forma a evitar o atrito entre a geometria e a amostra (Lau et al., 2000; Rao, 1992). Os dados de força e altura obtidos foram convertidos em tensão (σ_H) e deformação (ε_H) de Hencky, conforme as Equações 2 e 3, respectivamente (Steffe, 1996).

$$\sigma_H = F(t) \left[\frac{H(t)}{H_0 A_0} \right] \quad (2)$$

$$\varepsilon_H = -\ln \left[\frac{H(t)}{H_0} \right] \quad (3)$$

onde $F(t)$ é a força [N], A_0 [m²] e H_0 [m] são, respectivamente, a área e a altura iniciais da amostra e $H(t)$ é a altura do material no tempo t .

O ponto de ruptura foi considerado como o primeiro pico máximo da curva tensão versus deformação. O módulo de elasticidade (E) foi determinado a partir da tangente da região linear inicial (Equação 4) da curva tensão-deformação.

$$E = \left. \frac{d\sigma_H}{d\varepsilon_H} \right|_{\varepsilon \approx 0} \quad (4)$$

As propriedades mecânicas foram avaliadas em onze replicatas para os géis em membranas de diálise e seis replicatas para os géis em recipientes cilíndricos.

3.3.1.1.1) Modelo BST

Os dados de tensão versus deformação foram avaliados através do ajuste dos dados experimentais até o ponto de ruptura utilizando o modelo de Blatz et al. (1974) (Equação 5). Este modelo correlaciona a tensão e a deformação radial (Equação 6) na região que ocorre o desvio do comportamento ideal Hookeano (Figura 3.5).

$$\sigma_{BST} = \frac{2E_{BST}}{3\eta} (\lambda^\eta - \lambda^{-2\eta}) \quad (5)$$

$$\lambda = \frac{R_t}{R_0} \quad (6)$$

onde λ é a deformação radial (adimensional), R_0 é o raio inicial da amostra (m), R_t é a deformação radial (m) em t, σ_{BST} é a tensão, E é o módulo de elasticidade (Pa) e η (adimensional) está associado à deformação sendo uma medida empírica do desvio do comportamento ideal (em $\eta = 2$, a equação representa o comportamento elástico ideal). Materiais com comportamento “strain-hardening” e “strain-weakening” possuem $\eta > 2$ e $\eta < 2$, respectivamente.

Para o ajuste matemático não linear foi utilizado o modelo de regressão dos mínimos quadrados.

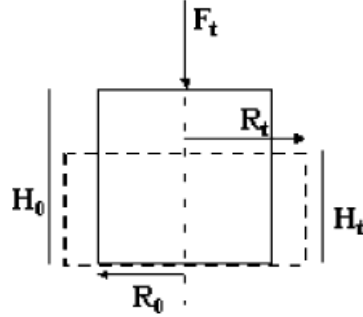


Figura 3.5. Representação esquemática da deformação normal (H_t) e radial (R_t) de uma amostra sob compressão uniaxial. A linha contínua representa a amostra antes da compressão e a linha tracejada representa a amostra comprimida em um determinado tempo. Fonte: Valim et al., “in press”.

3.3.1.1.2) Modelo reológico fractal

Foi utilizado o modelo de escala de Wu & Morbidelli (2001), o qual relaciona os parâmetros da estrutura microscópica (flocos fractais) de géis coloidais com suas propriedades elásticas macroscópicas. Segundo este modelo, a elasticidade dos géis (E) e seu limite de linearidade (γ_0) são descritos em função da concentração das partículas (ϕ), conforme uma equação do tipo lei de potência descrita nas Equações 7 e 8. Valores de γ_0 foram considerados como a deformação na qual os dados de tensão mostraram um desvio de 10% ou 20% em relação à parte linear (E), conforme descrito na Equação 12.

$$E \propto \phi^A \quad (7)$$

$$\gamma_0 \propto \phi^B \quad (8)$$

Sendo:

$$A = \frac{\beta}{(3 - D_f)} \quad (9)$$

$$B = \frac{(2 - \beta)}{(3 - D_f)} \quad (10)$$

$$\beta = 1 + (2 + x)(1 - \alpha) \quad (11)$$

$$\frac{\sigma - E}{E} = 0,1 \text{ ou } 0,2 \quad (12)$$

A dimensão fractal do gel é denominada D_f , sendo que o parâmetro x representa a dimensão fractal da cadeia principal ou irregularidade da rede, e seu valor normalmente varia de 1 a 1,3 para géis coloidais. O parâmetro α , que é compreendido entre 0 e 1, descreve os três possíveis regimes de gelificação: ligação forte ($\alpha = 0$) (ligações interfloculares são mais fortes que as intrafloculares, sendo a elasticidade do gel definida pelas ligações intrafloculares), ligação fraca ($\alpha = 1$) (flocos fractais são mais rígidos do que as ligações interfloculares, sendo a elasticidade então definida pelas ligações mais fracas) e géis de transição ($0 < \alpha < 1$) (ligações inter e intrafloculares contribuem para a elasticidade do gel).

3.3.1.2) Ensaios oscilatórios e em estado estacionário

Ensaios reológicos em estado estacionário e dinâmico foram realizados em um reômetro de tensão controlada Carri-Med CSL² 500 (TA Instruments, Inglaterra) com geometria cone-placa de aço inoxidável de 60 mm de diâmetro. Para os ensaios oscilatórios, colocou-se uma fina camada de óleo de silicone de baixa viscosidade ao redor da amostra para evitar a evaporação, principalmente nos ensaios de varredura de temperatura. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.3.1.2.1) Curvas de escoamento

As curvas de escoamento foram determinadas em um intervalo de taxa de deformação entre 0 e aproximadamente 300 s^{-1} na temperatura fixa de 10°C , utilizando o módulo de deformação controlada. Três rampas contínuas de escoamento foram efetuadas para a verificação da existência de dependência com o tempo: a primeira rampa com tensão crescente (de 0 a uma tensão equivalente à taxa de deformação de

300 s⁻¹) (Subida 1), seguida por uma rampa decrescente (Descida) e, posteriormente, por uma nova rampa crescente de tensão (Subida 2). Os parâmetros avaliados foram os parâmetros de ajuste de uma equação do tipo Lei da Potência (Equação 13) e o valor de viscosidade aparente a uma taxa de deformação arbitrariamente definida no valor de 100 s⁻¹.

$$\sigma = k \left(\dot{\gamma} \right)^n \quad (13)$$

onde $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação, n é o índice de comportamento e k é o índice de consistência.

3.3.1.2.2) Ensaios oscilatórios

Varreduras de tensão foram inicialmente realizadas a 10°C e a uma frequência constante de 1 Hz para determinar o intervalo de viscoelasticidade linear. Dentro do intervalo linear, foram realizados 2 tipos de ensaios, sendo eles:

1) Varreduras de temperatura: amostras foram colocadas no equipamento a 10°C e realizou-se uma varredura de temperatura de 10 a 90°C a uma taxa de aquecimento de 1°C/min e em seguida, uma varredura de temperatura de 90 a 10°C, também com a taxa de 1°C/min. Nos ensaios utilizou-se frequência de 1 Hz e tensão de 0,5 Pa.

2) Varreduras de frequência foram realizadas de 1 a 10 Hz, a 10°C e uma tensão constante de 0,5 Pa.

3.3.1.3) Viscosidade intrínseca

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ de soluções de polissacarídeo da linhaça (FG) foi avaliada utilizando um viscosímetro capilar Cannon-Fenske 100 (Cannon Instrument Co., EUA). As medidas foram realizadas na faixa de concentração de 0,004 a 0,05% (m/v). O

viscosímetro foi imerso em um banho de água mantido a $10 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Valores de viscosidade foram baseados em três leituras dos tempos de escoamento das soluções de FG. Corridas com solvente (água e soluções de CaCl_2 e NaCl , nas concentrações de 50 mM e 150 mM, respectivamente, correspondendo a uma $\mu = 150$) foram realizadas freqüentemente para calibrar o instrumento.

A viscosidade relativa de uma dada solução η_{rel} (definida como a razão entre as viscosidades da solução e do solvente) foi determinada e convertida em viscosidade específica (η_{esp}) usando a Equação 14.

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 \quad (14)$$

Quando a concentração da solução se aproxima de zero, a viscosidade reduzida (η_{esp}/C) se aproxima da viscosidade intrínseca, a qual é uma medida indireta do volume hidrodinâmico do polissacarídeo. A viscosidade reduzida foi graficada em relação à concentração, e a viscosidade intrínseca foi determinada pela extrapolação da reta na concentração igual à zero, pois segundo a teoria de Huggins, a baixas concentrações vale a relação apresentada na Equação 15.

$$\frac{\eta_{esp}}{C} = \left(\frac{\eta_{esp}}{C} \right)_{C=0} + K_H \left(\frac{\eta_{esp}}{C} \right)_{C=0}^2 \cdot C \quad (15)$$

onde η_{esp} (adimensional) é calculada pela Equação 14 e K_H é o coeficiente de Huggins ou coeficiente de interação (adimensional) (Freitas, 2002).

3.3.1.3.1) Estimativa da massa molecular

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ de um polímero em um dado solvente aumenta com a massa molecular. Essa relação constitui a base do método viscosimétrico para a avaliação da massa molecular de um polímero. Então, utilizou-se a Equação de Mark-

Houwink-Sakurada (Equação 16) (Beer et al., 1999) para determinar a massa molecular média da FG.

$$[\eta] = K.(M_v)^\alpha \quad (16)$$

onde M_v é a massa molecular viscosimétrica média e K e α são constantes viscosimétricas que variam em função da natureza do solvente, da temperatura e da estrutura química do polímero.

3.3.2) Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Os géis (preparados conforme descrito nos itens 3.2.3 e 3.2.4) foram cortados em pedaços de dimensões 10 mm x 3 mm x 1 mm e fixados em glutaraldeído (2,5% v/v) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 12 horas. Em seguida, as amostras foram enxaguadas duas vezes com tampão cacodilato, fraturadas em nitrogênio líquido e fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 2 horas. Após duas lavagens com água deionizada, os géis fraturados foram então desidratados com soluções de etanol (30, 50, 70 e 90% v/v), sendo realizado por último três lavagens com etanol 100% v/v. De forma a se evitar danos à estrutura durante a secagem, as amostras foram secas no ponto crítico do CO₂ (Critical Point Dryer CPD03 Balzers, Alzenau, Alemanha) e posteriormente, montadas em bases de alumínio (*stubs*) e cobertas com ouro em um Sputter Coater SCD 050-Balzers (Alzenau, Alemanha). Por fim, as amostras foram observadas em um microscópio JEOL JSM 5800 LV (Tokyo, Japão) (Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Unicamp) operado a 10 kV. Foram feitas dez imagens da estrutura dos géis puros de WPI e cinco imagens da estrutura dos géis WPI – FG, em magnitude de 500 x.

3.3.2.1) Avaliação da dimensão fractal (D_f) por análise de imagem SEM

As imagens microscópicas foram analisadas com o software ImageJ v1.36b (Rasband, 2008) e o plug in FracLac v2.4d ImageJ (Karperien, 2008). Micrografias foram transformadas de imagens RGB 16-bits para imagens em escala de cinza de 8-bits, com dimensão de 640-480 pixels. Os pixels referentes à estrutura contínua foram então marcados (“threshold”). O nível de escala de cinza usado para o “threshold” foi a mediana da distribuição de escala de cinza do histograma de cada imagem (Pugnali et al, 2005). Os valores de D_f que representam os agregados de cada estrutura foram calculados utilizando o método de contagem de caixas (Box counting method) (Kaye, 1989). A base do método de contagem de caixas consistiu em colocar várias grades sobre a imagem e reduzir constantemente o tamanho da grade. Para cada tamanho de grade foi contado o número de caixas contendo pixels referentes à estrutura (“foreground” pixels). A D_f foi baseada no cálculo da regra de escala, dado pela Equação 17.

$$D = - \frac{\log N_{\epsilon}}{\log \epsilon} \quad (17)$$

onde N_{ϵ} é o número de caixas em uma certa escala contendo parte da imagem (“foreground” pixels) e ϵ a escala correspondente (em pixels). Como a determinação da D_f pela análise de imagens é baseada em um espaço bidimensional, é necessário adicionar uma dimensão ao valor calculado D para representar a verdadeira estrutura tridimensional do gel, conforme Equação 18.

$$D_f = D + 1 \quad (18)$$

3.3.3) Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência foi utilizada para analisar a estrutura de soluções mistas de proteínas do soro (WPI) e polissacarídeo da linhaça (FG). Para essa análise, o corante Rodamina B (10 μ L de uma solução 1 mg/mL) foi adicionado às amostras de

maneira a marcar as moléculas de proteínas presentes. As soluções mistas foram então colocadas em lâminas, cobertas com lamínulas e observadas em um microscópio de fluorescência Leica DMI 4000B (Leica, Alemanha), utilizando-se lentes com aumento de 100 x (Perrechil, 2008).

3.3.4) Capacidade de retenção de água (WHC)

A capacidade de retenção de água dos géis foi determinada após 48 horas a 10°C. Os géis (preparados conforme descrito nos itens 3.2.3 e 3.2.4) foram cortados em pedaços de aproximadamente 1 g utilizando uma lâmina afiada e em seguida, foram envolvidos em papel de seda e papel de filtro antes de serem colocadas em tubos de centrífuga de capacidade de 50 mL. As amostras foram então, centrifugadas a 10°C e 124 g durante 5 minutos em uma centrífuga modelo Allegra 25 – R (Beckman Coulter, Alemanha) com rotor A-10.

A quantidade de água liberada dos géis foi quantificada gravimetricamente e a WHC calculada de acordo com a Equação 19, sendo expressa em porcentagem de água retida.

$$WHC = 100 \times \left[1 - \left(\frac{\text{água}_{\text{liberada}}(g)}{\text{água}_{\text{gel}}(g)} \right) \right] \quad (19)$$

onde $\text{água}_{\text{liberada}}$ é a quantidade de água retida no papel de seda e de filtro e água_{gel} é a quantidade inicial de água na amostra. Foram realizadas sete replicatas de cada amostra.

3.3.5) Determinação de cor

A análise de cor dos géis (preparados conforme descrito nos itens 3.2.3 e 3.2.4) foi realizada em espectrofotômetro de bancada Ultra Scan VIS (HunterLab, EUA)

(Laboratório de Engenharia de Processos, DEA, FEA, UNICAMP), previamente calibrado no módulo de reflectância especular excluída (RSEX), utilizando uma fonte de iluminação D65, ângulo de detecção de 10° e escala CIELAB (L^* , a^* , b^*). Medições de coloração foram expressas em termos da luminosidade L^* ($L^*=0$ preto e $L^*=100$ branco) e da cromaticidade definida por a^* ($+a^*$ = vermelho e $-a^*$ = verde) e b^* ($+b^*$ = amarelo e $-b^*$ = azul) (Ju & Kilara, 1998b). Os géis foram cortados (1,5 cm comprimento) e posicionados no orifício do equipamento para a realização das leituras. Foram realizadas seis repetições em cada amostra.

3.3.6) Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas ($p<0,05$) entre os tratamentos foram avaliadas pelo Teste de Tukey utilizando o programa STATISTICA 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA).

CAPÍTULO 4. Resultados e Discussão

Parte 1. Caracterização do polissacarídeo extraído das sementes de linho

4.1) Ensaios reológicos em cisalhamento

4.1.1) Curvas de escoamento

A Figura 4.1 (A, B e C) apresenta o comportamento reológico em estado estacionário da solução de polissacarídeo da linhaça (FG) (2% m/m) sem a adição de sais.

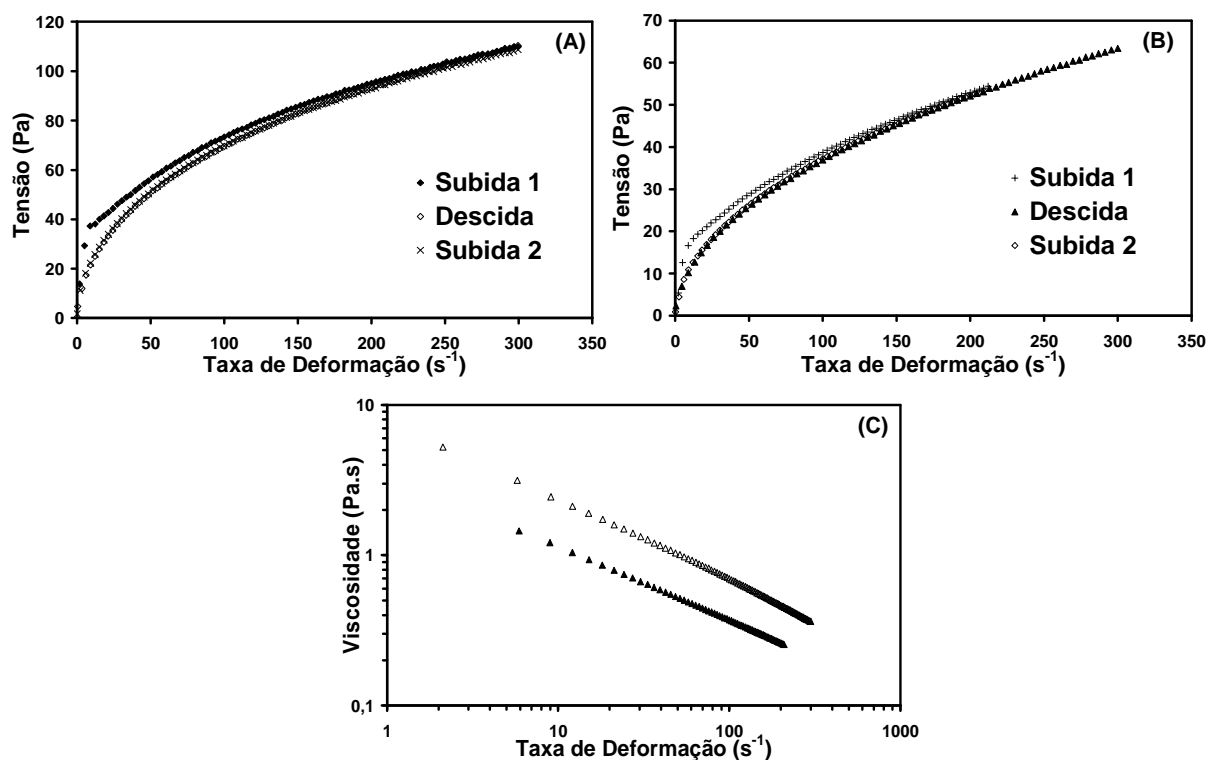


Figura 4.1. Curvas de escoamento (A, B) e viscosidade aparente (C) da solução de FG (2% m/m) sem a adição de sais a 10°C (A) e a 25°C (B). (Δ) 10°C e (\blacktriangle) 25°C.

A partir da Figura 4.1 (A e B), observa-se uma variação do comportamento reológico entre o ciclo ascendente e descendente de taxa de deformação, apresentando um comportamento levemente tixotrópico. Com relação ao segundo ciclo ascendente de taxa de deformação, observa-se um comportamento de fluido pseudoplástico, visto que a viscosidade aparente diminuiu com o aumento da taxa de deformação aplicada (Figura 4.1C). As causas mais comuns desse comportamento em suspensões coloidais são a ruptura de agregados de partículas e a orientação de partículas assimétricas provocadas

pelo aumento da taxa de deformação. O comportamento observado foi semelhante ao encontrado por Wang et al. (2008) e Mazza & Biliaderis (1989). Segundo Mazza & Biliaderis (1989), em concentrações entre 0,05 e 0,2% (m/v), as curvas de escoamento do polissacarídeo da linhaça (pH 6,5 e 25°C) apresentaram comportamento Newtoniano, enquanto que em concentrações acima de 0,2% (m/v), as soluções mostraram comportamento pseudoplástico, o que é típico de soluções poliméricas. Cui et al. (1994b), ao estudarem as propriedades reológicas do polissacarídeo da linhaça, encontraram nas condições ótimas de extração (temperatura 85-90°C, pH 6,5-7,0 e razão água:semente de 13,0) um comportamento pseudoplástico nas três concentrações estudadas, 5, 10 e 20 g/kg. Cui et al. (1994a) encontraram um comportamento pseudoplástico para o polissacarídeo da linhaça em concentrações acima de 1,0% em um intervalo de taxa de deformação entre 0,1 e 1000 s⁻¹ na temperatura fixa de 25°C. Nas concentrações de 0,3 e 0,5%, observaram um comportamento levemente pseudoplástico na região de alta deformação.

As curvas de escoamento foram ajustadas utilizando-se o modelo Lei da Potência (Equação 13) e os valores de viscosidade aparente a 100 s⁻¹ foram calculados (Tabela 4.1). A viscosidade nesta taxa de deformação foi escolhida arbitrariamente, dado que se correlaciona com alguns processos que ocorrem na produção de alimentos como, escoamento em tubulação, agitação ou mastigação de um alimento (Steffe, 1996).

Tabela 4.1. Efeito da temperatura do ensaio no índice de consistência (k), índice de comportamento (n) e viscosidade (η_{100}) a 100 s⁻¹ da solução de FG (2% m/m) sem a adição de sais.

	k (Pa.sⁿ)	n	η_{100} (Pa.s)
10°C	9,63 ^a	0,43 ^a	0,70 ^a
25°C	3,83 ^b	0,49 ^b	0,37 ^b

Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

A partir da Tabela 4.1, pode-se observar que o índice de comportamento (n) aumentou ($p < 0,05$) com o aumento da temperatura da solução de polissacarídeo da linhaça, enquanto que os valores de viscosidade a 100 s^{-1} e de índice de consistência (k) diminuíram ($p < 0,05$). Fedeniuk & Biliaderis (1994) encontraram resultados semelhantes para a fração neutra do polissacarídeo da linhaça (1,5% m/m) a 25°C , sendo $n = 0,53$ e $k = 3,19 \text{ Pa.s}^n$. Uma diminuição no índice de consistência (k) com o aumento da temperatura para uma solução mista de polissacarídeo da linhaça e amido de milho também foi observado (Wang et al., 2008).

4.1.2) Ensaios oscilatórios

Primeiramente, foram realizadas varreduras de tensão a 10°C e a uma frequência constante de 1 Hz para determinar o intervalo de viscoelasticidade linear, dentro do qual foram realizados os demais ensaios oscilatórios. Na Figura 4.2 está apresentada uma varredura de frequência da solução de polissacarídeo da linhaça (FG) (2% m/m) sem a adição de sais.

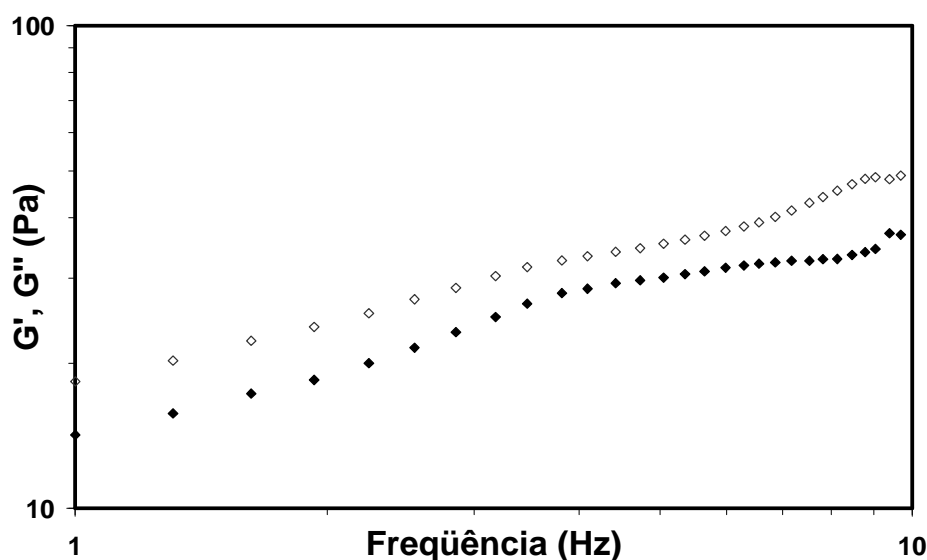


Figura 4.2. Variação do módulo elástico (G') (\diamond) e do módulo viscoso (G'') (\blacklozenge) com a frequência da solução de FG (2% m/m) sem a adição de sais a 10°C e tensão de 0,5 Pa.

Analisando-se a Figura 4.2, observa-se que a solução de polissacarídeo da linhaça (2% m/m) apresentou comportamento de gel fraco, pois mostrou G' maior do que G'' , mas G' e G'' mostraram forte dependência em relação à frequência. Tal resultado foi semelhante aos encontrados por Cui et al. (1994a,b) a 25°C, nesta mesma concentração de polissacarídeo e por Wang et al. (2008) a 25°C, na concentração de 0,5% (m/m).

A Tabela 4.2 apresenta os valores dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') no início e no final de cada etapa do ensaio de varredura de temperatura para as amostras de FG (2% m/m) sem e com a adição de sais de cálcio ($\mu = 150$).

Tabela 4.2. Valores dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') das amostras de FG (2% m/m) sem e com a adição de sais de cálcio ($\mu = 150$) em cada etapa do ensaio de varredura de temperatura.

Módulo Elástico (Pa)				
	Aquecimento		Resfriamento	
	10°C	90°C	10°C	90°C
Sem sal	18,5	3,0	32,6	3,1
CaCl ₂	11,6	0,8	26,1	1,3
Módulo Viscoso (Pa)				
	Aquecimento		Resfriamento	
	10°C	90°C	10°C	90°C
Sem sal	15,4	2,8	16,7	2,7
CaCl ₂	10,7	1,1	11,6	1,3

As Figuras 4.3 e 4.4 mostram como os valores de G' e G'' variaram com a temperatura no aquecimento e no resfriamento, respectivamente, utilizando frequência de 1 Hz e tensão de 0,5 Pa.

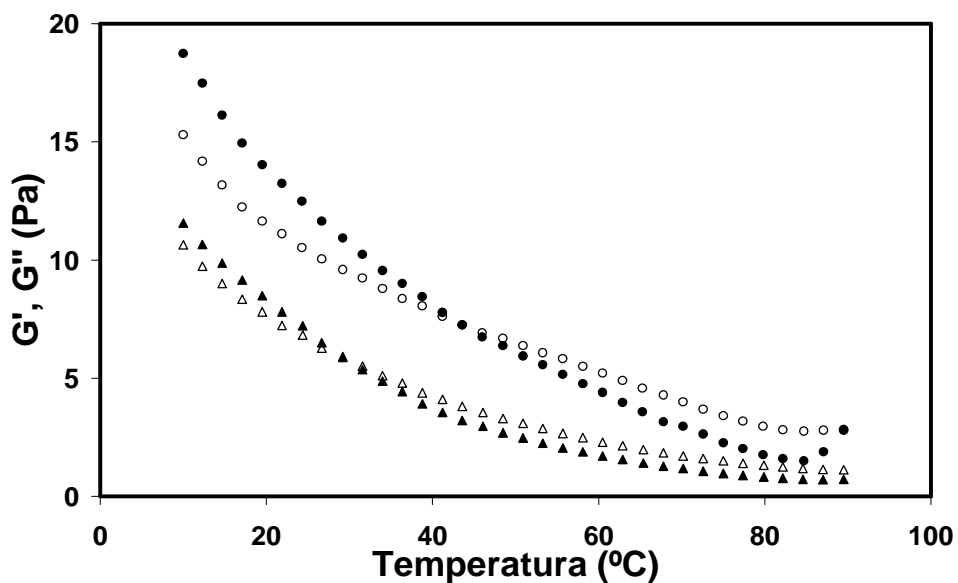


Figura 4.3. Módulo elástico (G') ((●) sem sal, (▲) CaCl_2) e módulo viscoso (G'') ((○) sem sal, (△) CaCl_2) durante o aquecimento das amostras de FG (2% m/m) sem e com a adição de sais ($\mu = 150$).

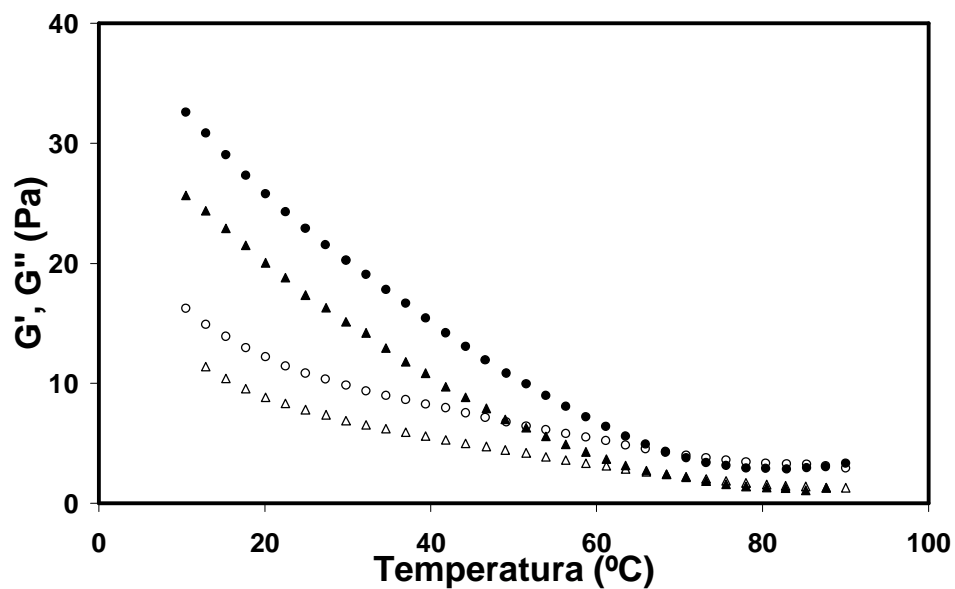


Figura 4.4. Módulo elástico (G') ((●) sem sal, (▲) CaCl_2) e módulo viscoso (G'') ((○) sem sal, (△) CaCl_2) durante o resfriamento das amostras de FG (2% m/m) sem e com a adição de sais ($\mu = 150$).

Analisando a Tabela 4.2 e a Figura 4.3, observa-se que, durante o aquecimento, a amostra sem a adição de sais apresentou caráter elástico e viscoso um pouco mais pronunciado que o sistema com a adição de CaCl_2 ($\mu = 150$). Chen et al. (2006a) avaliaram o efeito da adição de sais (NaCl ou CaCl_2) sobre a força do gel de goma de linhaça através de ensaios de compressão e encontraram que a adição de NaCl a géis de FG (2% m/m) resultou na redução da força do gel, enquanto que a adição de pequenas quantidades de CaCl_2 (até 0,3% m/m) levou a um aumento da mesma. Segundo os autores, quando pequenas quantidades de CaCl_2 são adicionadas à solução, o cálcio induz a ligação entre as moléculas de polissacarídeo estimulando a formação de redes tridimensionais, o que é comumente observado para a pectina. Porém, um efeito de repulsão eletrostática predominante foi observado quando adicionadas grandes quantidades de CaCl_2 e, por isso, a formação da rede tridimensional foi inibida e a força do gel diminuiu. Estes resultados foram semelhantes ao encontrado neste trabalho através de ensaios em cisalhamento, ambos a baixas deformações, sendo que a concentração salina utilizada foi superior ($\mu = 150$) à utilizada pelos autores quando observaram aumento na força do gel com a adição de CaCl_2 (abaixo de 0,3% (m/m), que equivale a $\mu = 81$).

A 10°C todas as amostras possuíam G' maior que G'' , ou seja, suas características reológicas eram típicas de gel e a 90°C, a amostra com adição de sais de cálcio ($\mu = 150$) apresentou módulo viscoso maior que o módulo elástico, indicando caráter líquido, enquanto que a sem adição de sais apresentou G' um pouco maior que G'' (Tabela 4.2). De acordo com estes resultados, pode-se dizer que o polissacarídeo apresentou-se como um gel termorreversível, o qual dissolveu no aquecimento e gelificou no resfriamento, o que é similar ao encontrado por Chen et al. (2006a).

A Tabela 4.3 apresenta os valores de cruze de G' com G'' para os diferentes sistemas estudados em cada etapa dos ensaios. Reologicamente, a interseção de G' e G'' é conhecida como um dos critérios para a definição do ponto de gel (Chen et al., 2006a). Em uma varredura de temperatura em que a frequência é constante, o cruze desses dois parâmetros pode ser interpretado como a mudança da característica viscoelástica predominante da amostra.

Tabela 4.3. Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) de cruze de G' e G'' das amostras de FG (2% m/m) sem e com a adição de sais de cálcio ($\mu = 150$) em cada etapa do ensaio.

Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) de cruze de G' e G''		
	Aquecimento	Resfriamento
Sem sal	38,5	67,6
CaCl_2	29,6	73,2

O ponto de cruze de G' e G'' durante o resfriamento ocorreu primeiro para a amostra com adição de sais de cálcio, seguido pela amostra sem a adição de sais, indicando que nesta temperatura a característica reológica das amostras passou de predominantemente viscosa para predominantemente elástica. Segundo Chen et al. (2006a), iniciando-se o resfriamento de uma solução de FG (1% m/m) sem adição de sais em 90°C , obteve-se o ponto de cruze de G' e G'' (temperatura de gelificação) em uma temperatura de aproximadamente $66,6^{\circ}\text{C}$, o que está de acordo com o encontrado neste trabalho.

As temperaturas de cruze de G' e G'' foram menores no aquecimento que no resfriamento (Tabela 4.3). No aquecimento, a amostra sem adição de sais exibiu propriedades de um gel fraco em temperaturas menores que 38°C , o que também está de acordo com o encontrado por Chen et al. (2006a).

4.2) Viscosidade intrínseca

A viscosidade intrínseca, medida indireta da massa molecular e extensão da cadeia, foi determinada para cada amostra usando a expressão empírica de Huggins (Equação 15). Os valores de viscosidade intrínseca foram obtidos através dos gráficos de viscosidade reduzida (η_{esp}/C) em relação à concentração de polissacarídeo, extrapolando a reta obtida para concentração de polissacarídeo igual à zero. Na Figura 4.5 (A, B e C) são exibidos ajustes da Equação de Huggins aos pontos experimentais de polissacarídeo da linhaça (FG) dissolvido em água, solução de NaCl (150 mM) e solução de CaCl_2 (50 mM), respectivamente. A tangente das curvas de viscosidade reduzida versus concentração é igual à K_H , que é uma medida da interação polímero-polímero em concentração diluída e também pode fornecer informações sobre a qualidade do solvente. Em “bons solvantes”, o contato solvente-polímero é preferido e isto minimiza interações entre polímeros. No caso de “solvantes pobres”, as moléculas de polímero têm uma afinidade relativamente baixa com o solvente e tendem a se aderir aos segmentos de polímeros das moléculas vizinhas (Lapasin & Prici, 1995). Esta análise é normalmente restrita a baixas concentrações devido à dificuldade de definir as interações cadeia-cadeia a altas concentrações.

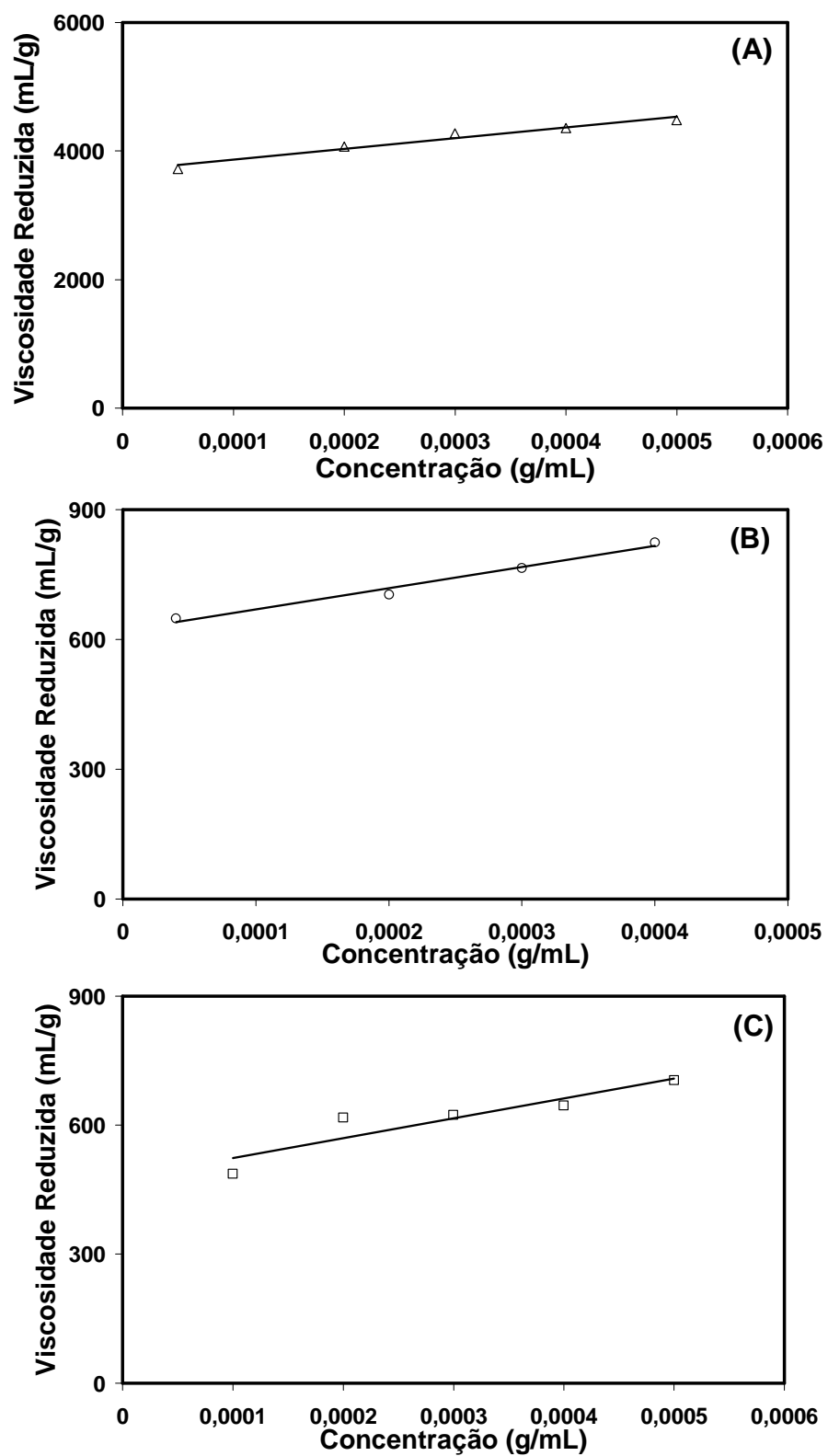


Figura 4.5. Equação de Huggins para FG em (A) água, (B) NaCl (150 mM) e (C) CaCl₂ (50 mM).

Na aplicação da Equação de Huggins foi utilizado o intervalo de concentração de 0,004 a 0,05% (m/v). Na Tabela 4.4 estão apresentados os valores de viscosidade intrínseca $[\eta]$ e K_H da FG em diferentes solventes.

Tabela 4.4. Valores de viscosidade intrínseca $[\eta]$ da FG disperso em diferentes solventes a 10°C.

Amostras	K_H	$[\eta]$ (mL/g)	R^2
Água	$0,08 \pm 0,01$	$3863,80 \pm 34,16$	0,999
NaCl 150 mM	$0,79 \pm 0,17$	$635,06 \pm 33,94$	0,991
CaCl ₂ 50 mM	$1,83 \pm 0,11$	$485,58 \pm 25,26$	0,995

Observa-se que os valores de $[\eta]$ em água deionizada são bem superiores aos valores em soluções de CaCl₂ (50 mM) e de NaCl (150 mM) pelo fato de que na água as macromoléculas do polímero estão dispersas, enquanto que na presença de sais, os seus grupos carregados negativamente acabam ligando-se aos íons salinos, tornando as cadeias mais compactas e diminuindo a $[\eta]$. Tendo o polissacarídeo da linhaça uma fração ácida em sua estrutura, espera-se que exista um efeito de polieletrólito. A viscosidade intrínseca de polieletrólitos normalmente decresce com o aumento da força iônica, devido à redução de repulsões eletrostáticas intra e intermoleculares, o que permite a contração das moléculas para a forma menos expandida (Goh et al., 2006).

Cui & Mazza (1996), avaliando a viscosidade intrínseca do polissacarídeo extraído de quatro diferentes cultivares de linhaça, encontraram resultados semelhantes ao deste trabalho, que variaram de 434 a 658 mL/g em solução de NaCl (1 M). Goh et al. (2006) encontraram uma $[\eta]$ de 1030 ± 20 mL/g em água deionizada a 20°C. Segundo os autores, a viscosidade intrínseca foi influenciada pela fração de alta massa molecular do polissacarídeo apesar dela estar presente em menor quantidade. Para comparação com outros valores da literatura, eles determinaram a $[\eta]$ do polissacarídeo da linhaça em 1 M

de NaCl, sendo ela de aproximadamente 345 mL/g. Fedeniuk & Biliaderis (1994) encontraram uma viscosidade intrínseca em 0,2 M de NaCl de 660 mL/g para a fração neutra do polissacarídeo da linhaça e de 460 mL/g para a porção ácida a 25°C, resultado este semelhante ao encontrado no presente trabalho. A diferença entre os resultados obtidos e os apresentados pela literatura pode ser uma consequência da variação na composição do polissacarídeo que é influenciada pelas condições climáticas onde a safra da linhaça foi cultivada (Goh et al., 2006) e pelas condições de extração.

De maneira geral, à medida que aumenta a viscosidade intrínseca (maior expansão da cadeia polimérica) o coeficiente de Huggins diminui (Tabela 4.4), e quanto menor o valor desse coeficiente, menos interações polímero-polímero existem no sistema. Portanto, analisando-se os resultados obtidos pode-se dizer que, entre os solventes estudados, a água foi quem apresentou-se como o melhor solvente, visto que o K_H obtido foi bastante baixo (0,08), indicando que houve grande interação solvente-polímero devido à dispersão das macromoléculas do polímero em água. Quando a FG esteve dispersa em solução salina de CaCl_2 ela apresentou maior valor de K_H (1,83) em relação ao seu valor quando dispersa em NaCl, caracterizando a solução de cálcio como um “solvente pobre”. Acredita-se que este resultado é devido à capacidade dos cátions divalentes em realizar ligações cruzadas entre os grupos carregados negativamente dos polímeros, facilitando as interações polímero-polímero e diminuindo as ligações solvente-polímero.

A goma da linhaça é composta de dois polissacarídeos: uma fração neutra (arabinoxilana) e uma ácida, semelhante ao da pectina (Cui & Mazza, 1996). Para determinar a massa molecular do polissacarídeo da linhaça, a partir da Equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 16), optou-se por utilizar as constantes K e α da pectina para o cálculo, sendo elas 0,0436 e 0,78, respectivamente (Díaz-Rojas et al., 2004). Sendo assim, a massa molecular média estimada por viscosimetria foi de $2,2 \cdot 10^5$ Da em solução de NaCl (150 mM) e de $1,5 \cdot 10^5$ Da em solução de CaCl_2 (50 mM). Warrand et al.

(2003), utilizando cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) acoplada a um “multiangle laser light scattering” (MALLS), sendo esta última, uma técnica de medida baseada no espalhamento de luz incidente sobre a amostra, determinaram que a fração neutra do polissacarídeo (~75%) é uma arabinoxilana ($M_w = 1,16 \cdot 10^6$ Da) e que a fração ácida consiste em duas frações de ramnogalacturonana, semelhante à pectina (3,75%, $M_w = 6,5 \cdot 10^5$ Da e 21,25%, $1,7 \cdot 10^4$ Da). Warrand et al. (2005) determinaram também a massa molecular das três principais subfrações de polímeros da fração neutra do polissacarídeo, sendo a menor parte (11,1%) com a maior massa molecular ($5,7 \cdot 10^6$ Da) e as outras duas tiveram menor massa molecular (42,3%, $M_w = 9,3 \cdot 10^5$ Da e 45,3%, $M_w = 3,2 \cdot 10^5$ Da). Segundo os autores, estes resultados reforçam a existência de três arabinoxilanas na fração neutra do polissacarídeo da linhaça. Com isso, pode-se dizer que os valores de massa molecular média estimados por viscosimetria estão de acordo com o encontrado nestes trabalhos, apesar de não terem sido determinados para cada fração do polissacarídeo e utilizando técnicas mais adequadas para a identificação dos compostos e medida da massa molecular.

CAPÍTULO 4. Resultados e Discussão

Parte 2. Avaliação das propriedades dos sistemas de proteínas do soro gelificadas a frio pela adição de sais de cálcio ou sódio

4.3) Análise visual

A aparência e as propriedades do gel formado dependem da natureza dos agregados de proteína (Bryant & McClements, 1998). A aparência dos géis pode ser considerada como um bom indicador do tipo de rede formada. O gel formado por uma estrutura ordenada (agregação linear) apresenta-se translúcido, enquanto que o gel formado por agregados particulados apresenta-se opaco devido ao maior tamanho das partículas e agregação aleatória, favorecida pela neutralização de cargas (Bryant & McClements, 1998; Doi, 1993).

Através da análise visual, foi possível observar claramente que a adição de diferentes sais por difusão utilizando membranas de diálise levou à formação de dois tipos de sistemas: translúcido e opaco. A Figura 4.6 apresenta géis contendo (A) 7% (m/m) de WPI e formados pela adição de sais de cálcio (7% WPI- CaCl_2) ou (B) sódio (7% WPI-NaCl) e ainda (C) 5% (m/m) de WPI formados pela adição de sais de sódio (5% WPI-NaCl). Como pode-se observar, os géis com adição de CaCl_2 apresentaram-se bastante opacos (esbranquiçados), enquanto os géis com NaCl eram translúcidos. Na concentração de 5% (m/m) de WPI com adição de sais de sódio formou-se um gel não auto-sustentável (não manteve a forma quando removido das membranas de diálise) (Figura 4.6C), o qual não foi submetido aos ensaios de compressão.

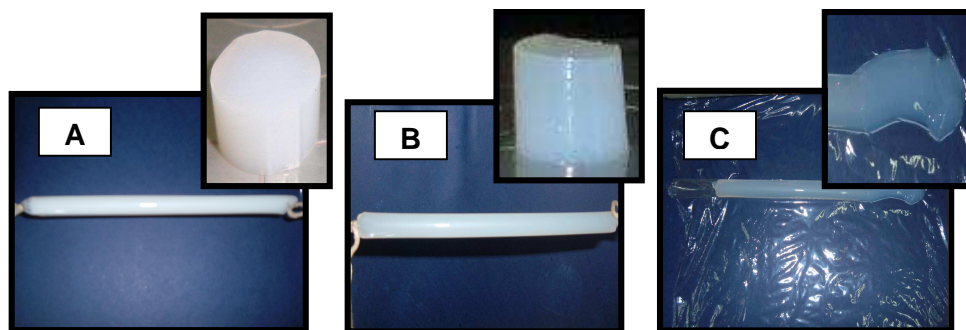


Figura 4.6. Géis de WPI formados a frio através da adição de sais. (A) 7% WPI- CaCl_2 , (B) 7% WPI-NaCl e (C) 5% WPI-NaCl não auto-sustentável. O detalhe mostra os géis removidos das membranas de diálise.

4.4) Determinação de cor

A Figura 4.7 mostra parâmetros analisados (L^* , a^* e b^*) em função da concentração (% m/m) de proteínas do soro (WPI) e do tipo de sal adicionado para a formação dos géis (Figuras 4.7A, B e C, respectivamente).

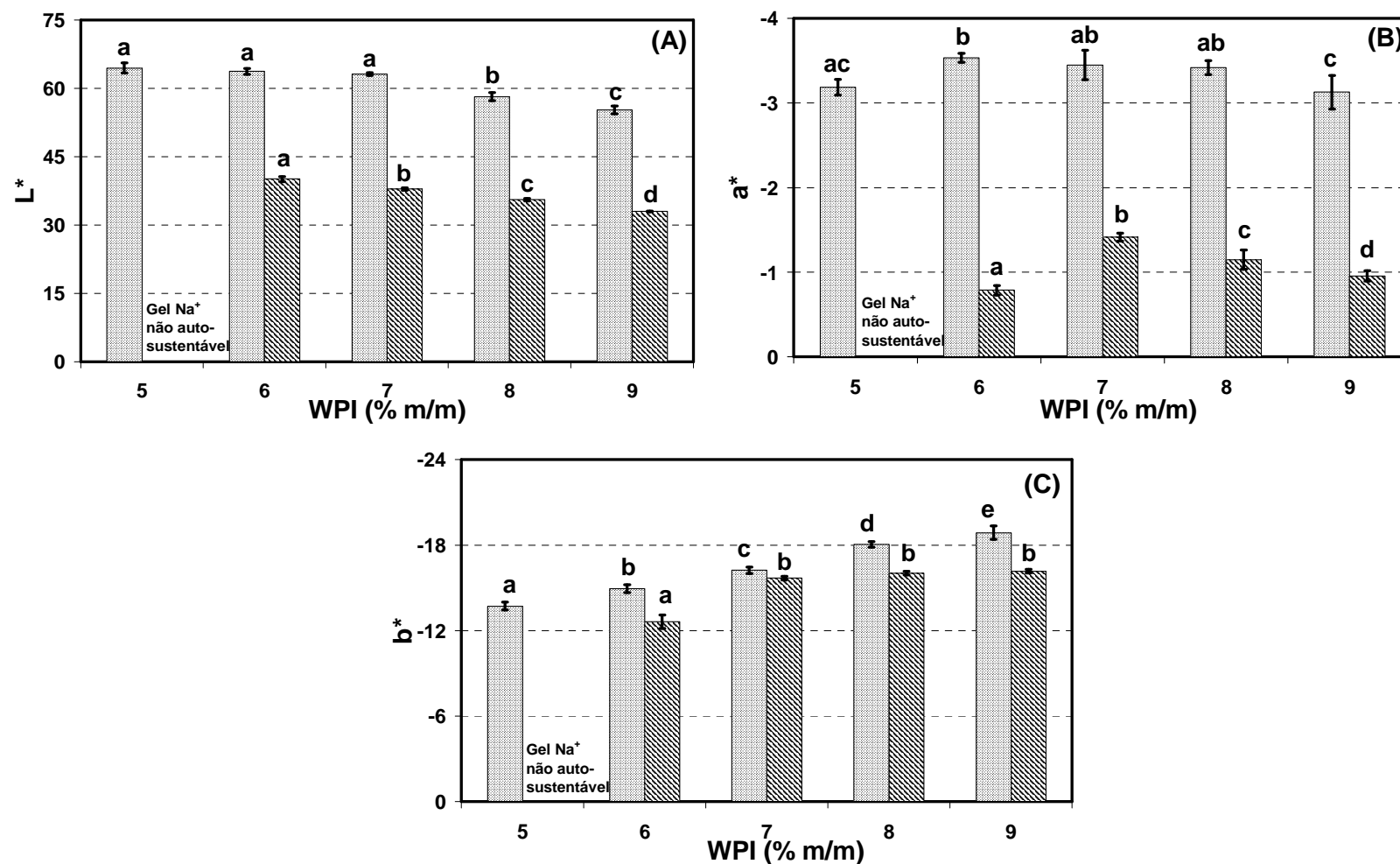


Figura 4.7. Parâmetros de luminosidade (L^*) (A) e de cromaticidade (a^* e b^*) (B e C) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 (□) ou NaCl (▨) utilizando membranas de diálise. As barras representam o desvio padrão entre as replicatas. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de proteína em cada sal estudado.

Analisando-se o parâmetro de luminosidade L^* (Figura 4.7A), relacionado à claridade da amostra, verifica-se que ambos os géis (CaCl_2 e NaCl) apresentaram tendência similar, a diminuição do parâmetro L^* com o aumento da concentração de WPI, porém para os géis de NaCl , esta diminuição foi significativa ($p < 0,05$) em todas as concentrações enquanto que, para os géis de CaCl_2 , foi significativo ($p < 0,05$) só acima de 7% (m/m) de WPI. Marangoni et al. (2000) e Hongsprabhas & Barbut (1997b), que estudaram o efeito da concentração de WPI (6-10% m/m) e do nível de CaCl_2 (5-150 mM) sobre as características dos géis formados a frio, concluíram que a luminosidade (claridade) do gel aumentou com o aumento da concentração de CaCl_2 e/ou com a diminuição da concentração de proteína. Este aumento do parâmetro L^* foi relacionado ao aumento da opacidade do gel. A adição de CaCl_2 a suspensões pré-aquecidas de WPI (10% m/v) resultaram na formação de géis menos claros se comparados aos géis com menores concentrações de proteína, o que indica que uma rede mais ordenada de proteína foi formada em maiores concentrações. Segundo os autores, a rede ordenada do gel é usualmente resultado de menos agregação e mais organização na estrutura do gel. As interações intermoleculares que ocorrem durante o aquecimento são mais predominantes em maiores concentrações de proteína e parecem ser importantes na determinação da natureza da rede, principalmente pelo aumento no número de grupos reativos na superfície dos agregados. Marangoni et al. (2000) estudaram ainda o efeito da concentração de WPI (9-12% m/m) e do nível de NaCl (200-400 mM), e encontraram resultados semelhantes, ou seja, aumento da claridade do gel com o aumento da concentração de NaCl e/ou diminuição da concentração de proteína.

Com relação aos resultados obtidos para o parâmetro a^* (Figura 4.7B), relacionados à intensidade da cor verde ($-a^*$), pode-se observar que os géis de CaCl_2 foram pouco influenciados pela concentração de WPI, porém os géis de NaCl sofreram influência significativa ($p < 0,05$) em todas as concentrações de proteína. Quanto aos

valores do parâmetro b^* (Figura 4.7C), relacionados à intensidade da cor azul ($-b^*$), o aumento na concentração de WPI provocou uma diminuição nos mesmos (aumento da intensidade da cor azul). Para os géis de CaCl_2 , esta diminuição nos valores do parâmetro b^* foi significativa ($p < 0,05$) em todas as concentrações de WPI, enquanto que para os géis de NaCl foi significativa ($p < 0,05$) só no aumento de 6% – 7% (m/m).

4.5) Propriedades mecânicas

A Figura 4.8 mostra os valores correspondentes à tensão e deformação na ruptura dos géis de WPI formados pela adição de CaCl_2 ou NaCl (Figuras 4.8A e B, respectivamente). Os géis com adição de cloreto de sódio não apresentaram ponto de ruptura até 80% de deformação, sendo então analisados em termos dos valores de tensão e deformação máximas.

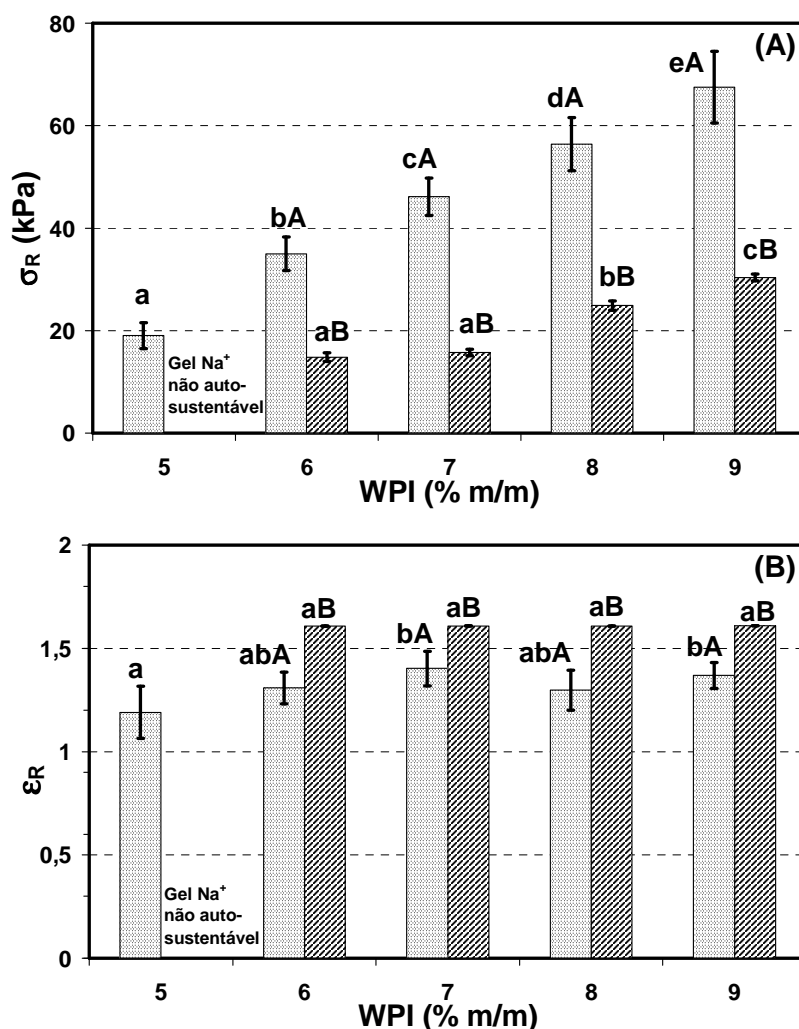


Figura 4.8. Propriedades mecânicas dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 (▨) ou NaCl (▩) utilizando membranas de diálise. (A) Tensão na ruptura (σ_R) e (B) Deformação na ruptura (ϵ_R). As barras representam o desvio padrão entre as replicatas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de proteína em cada sal estudado. Letras maiúsculas: diferenças entre os sais estudados na mesma concentração de proteína.

Os géis apresentaram aumento nos valores de tensão na ruptura com o aumento na concentração de WPI devido ao maior número de interações estabelecidas (Ju & Kilara, 1998a,c). O aumento na tensão de ruptura está relacionado à estrutura do gel formado e conseqüentemente ao processo empregado na formação deste gel. Quando as proteínas são desnaturadas, regiões hidrofóbicas e grupos sulfidrilas são expostos

(Bryant & McClements, 1998; Bottomley et al., 1990), possibilitando o estabelecimento de interações do tipo covalentes e não covalentes após a adição de sais, levando à formação de rede e conseqüente aumento das características elásticas dos sistemas. Os géis induzidos por CaCl_2 (cátion divalente) mostraram maiores valores de tensão na ruptura (Figura 4.8A) do que os induzidos por NaCl (cátion monovalente), o que pode ser explicado pelo tipo de interação que os cátions divalentes promovem. Eles estabilizam diretamente as interações entre grupos carboxílicos adjacentes negativamente carregados das cadeias de proteína, diferente dos cátions monovalentes que promovem primeiramente o decréscimo da repulsão eletrostática existente entre os grupos carboxílicos para então possibilitar a interação entre grupos hidrofóbicos expostos (Bryant & McClements, 1998). Dessa forma, os cátions divalentes são necessários em menores concentrações que os monovalentes para causarem agregação devido a sua maior eficiência em reduzir a repulsão eletrostática e habilidade de formar pontes entre os agregados de carga negativa (Totosa et al., 2002; Foegeding et al., 2002; Bryant & McClements, 2000b, 1998; Hongprabhas & Barbut, 1997b).

Os géis de NaCl apresentaram valores de deformabilidade significativamente maiores do que os géis de CaCl_2 (Figura 4.8B), porém sem influência significativa ($p>0,05$) do aumento da concentração de WPI. Enquanto que, a deformabilidade dos géis de CaCl_2 apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) nas concentrações de 7% e 9% (m/m) de WPI em relação ao gel 5% (m/m) de WPI.

A Figura 4.9 apresenta os resultados correspondentes ao módulo de elasticidade dos géis de WPI formados pela adição de CaCl_2 ou NaCl .

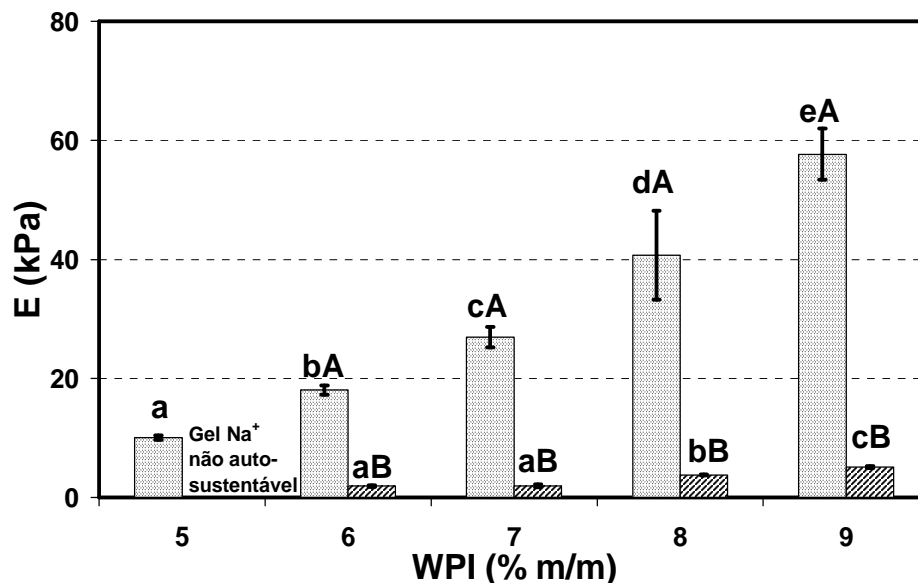


Figura 4.9. Módulo de elasticidade (E) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 (□) ou NaCl (▨) utilizando membranas de diálise. As barras representam o desvio padrão entre as replicatas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de proteína em cada sal estudado. Letras maiúsculas: diferenças entre os sais estudados na mesma concentração de proteína.

Com relação aos resultados obtidos para o módulo de elasticidade (Figura 4.9) uma tendência similar à da tensão na ruptura foi observada, porém estes valores mostraram-se muito mais dependentes do tipo de sal adicionado do que os valores de tensão na ruptura. Com o aumento da concentração de proteína, tanto as interações hidrofóbicas intermoleculares quanto a formação de ligações dissulfídicas aumentam e, por isso, em baixa concentração de proteína, estas forças intermoleculares têm menor efeito na estabilização da rede (Hongprabhas & Barbut, 1997b).

Na etapa da indução do gel a frio de proteínas do soro, o aumento da concentração protéica (6-10% m/v) e/ou de CaCl_2 (5-30 mM) favoreceu o aumento do módulo de elasticidade (Marangoni et al., 2000; Hongprabhas et al., 1999). No entanto, Marangoni et al. (2000) observaram que o aumento da concentração de NaCl (200-400 mM) diminuiu esta propriedade mecânica. Estes resultados foram semelhantes aos

encontrados no presente trabalho no que diz respeito à variação na concentração de proteína, enquanto que a variação na concentração de sal não foi avaliada. É possível que a diminuição na elasticidade e rigidez dos géis observada por outros autores nas maiores concentrações de NaCl, possa ter sido causado pelo fenômeno conhecido como “salting out”. Neste caso, as altas concentrações de sal levam a uma diminuição na solubilidade protéica devido a uma competição entre a proteína e os íons de sal pelas moléculas de água, fazendo com que a água se torne um mau solvente, e resultando em uma auto-associação das proteínas.

4.5.1) Modelagem do comportamento não-linear sob compressão utilizando a Equação de BST

O parâmetro não-linear η foi proposto para ser uma estimativa da medida do desvio do comportamento ideal elástico, sendo que para $\eta = 2$ o material comporta-se como um sólido ideal, para $\eta > 2$ ele exibe comportamento “strain-hardening” e para $\eta < 2$, exibe comportamento “strain-weakening” (Equação 5). A Figura 4.10 (A e B) mostra os dados de tensão (σ) em função da deformação radial (λ) obtidos para os géis de WPI formados pela adição de CaCl_2 e de NaCl, respectivamente, assim como os valores de tensão obtidos pelo ajuste dos dados segundo o modelo de BST (Equação 5). Pode-se observar que os dados de tensão-deformação dos géis ajustaram-se adequadamente ao modelo de BST, pois os valores de R^2 foram maiores do que 0,99 (Figura 4.10).

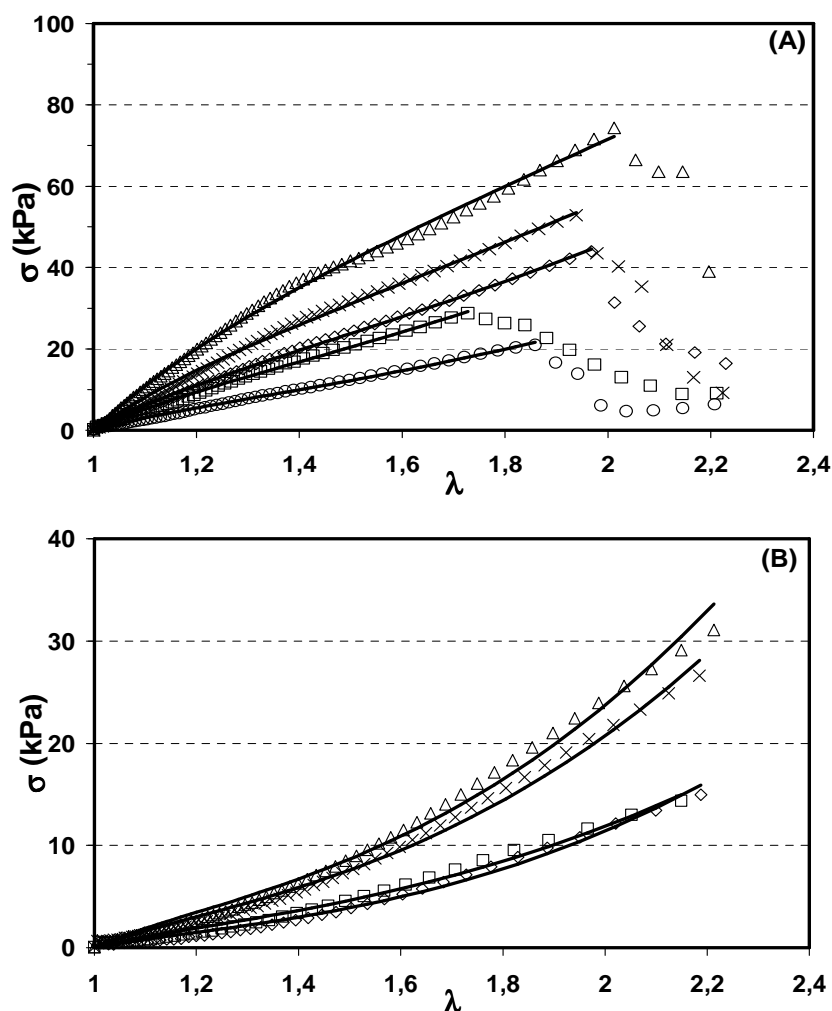


Figura 4.10. Valores preditos (—) e experimentais de tensão-deformação de géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de (A) CaCl_2 ou (B) NaCl em membranas de diálise nas concentrações de WPI (o) 5%, (\square) 6%, (\diamond) 7%, (\times) 8% e (Δ) 9% (m/m).

Os géis de WPI- CaCl_2 apresentaram ponto de ruptura, o qual foi evidenciado pelo valor máximo de tensão seguido pelo decréscimo do mesmo, como pode ser verificado na Figura 4.10A. No entanto, os géis de WPI- NaCl não apresentaram ponto de ruptura até 80% de deformação (Figura 4.10B), como discutido anteriormente. Este comportamento está associado a um comportamento “strain-hardening” dos géis WPI- NaCl . Isso fica evidente a partir dos resultados do parâmetro η obtido a partir do ajuste da Equação de BST (Figura 4.11).

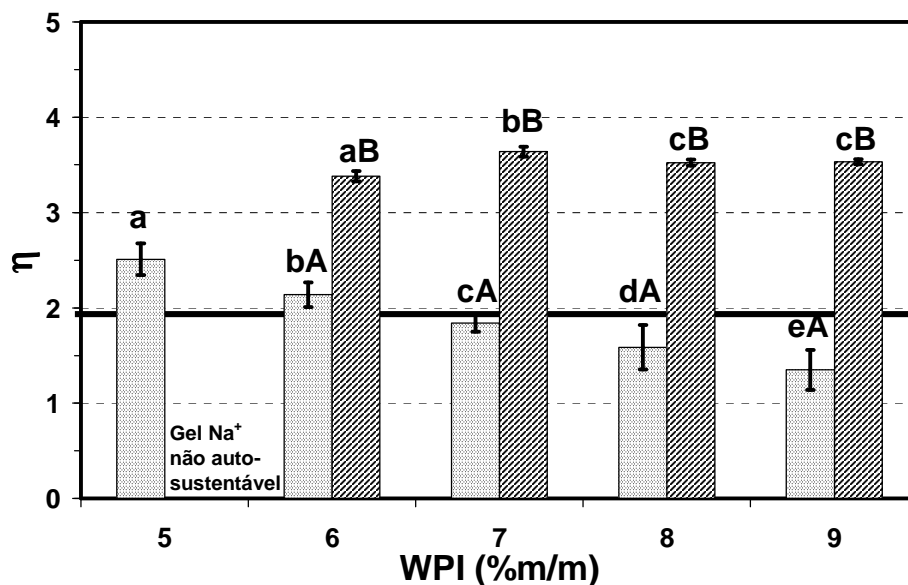


Figura 4.11. Parâmetro não-linear obtido da Equação de BST (η) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 (▨) ou NaCl (▩) utilizando membranas de diálise. As barras representam o desvio padrão entre as replicatas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de proteína em cada sal estudado. Letras maiúsculas: diferenças entre os sais estudados na mesma concentração de proteína.

De acordo com a Figura 4.11, pode-se observar que os géis de NaCl exibiram valores de η em torno de 3,5 com influência significativa ($p < 0,05$) da concentração até 8% (m/m) de WPI, indicando um comportamento “strain-hardening”. No entanto, os géis de CaCl_2 mostraram diminuição significativa ($p < 0,05$) nos valores de η com o aumento na concentração de WPI, exibindo valores entre 2,5 e 1,4 (tendência ao comportamento “strain-weakening” em altas deformações). Vardhanabhuti et al. (2001), ao substituírem as proteínas do soro nativas por agregados de proteínas solúveis desnaturadas (polímeros de WP), também encontraram um comportamento “strain-hardening” para os géis de NaCl (200 mM) e uma diminuição no parâmetro η para os géis de CaCl_2 (10 mM), apesar de apresentar o mesmo tipo de comportamento.

Os resultados obtidos sugerem uma relação entre o tipo de estrutura formada (ou interações envolvidas na estrutura do gel de acordo com o processo de gelificação) e a sua deformabilidade. A estrutura ordenada (translúcida) foi obtida para os géis de NaCl (Figura 4.6) e no entanto, estes géis apresentaram os maiores valores de η , em torno de 3,5. Este fato, provavelmente está associado à formação de ligações dissulfídicas entre as frações de proteína. No entanto, no caso dos géis de CaCl_2 , é possível correlacionar a presença de interações eletrostáticas e de uma estrutura mais desordenada com o predomínio do comportamento “strain-weakening” (Figura 4.11). Portanto, a estrutura mais ordenada poderia ser capaz de absorver maior quantidade de energia fornecida ao sistema durante a compressão, enquanto que os géis particulados mostram uma tendência de dissipar esta energia de compressão através da ruptura em menores deformações causada por sua estrutura menos homogênea (Valim et al., “in press”).

4.6) Capacidade de retenção de água (WHC)

Os resultados obtidos para a capacidade de retenção de água dos géis compostos por proteínas do soro formados a frio através da adição de sais de cálcio ou sódio estão apresentados na Figura 4.12. Pode-se observar que os géis apresentaram capacidade de retenção de água acima de 85%. Géis formados por NaCl apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores de WHC somente com o aumento da concentração de 7% – 8% (m/m) de WPI. Já os formados por CaCl_2 , apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) com o aumento na concentração de 6% – 7% (m/m) de WPI e de 7% – 8% (m/m) de WPI. Observa-se que, quanto maior a concentração de WPI, maior foi a quantidade de água retida em relação à quantidade de água total do gel (Bryant & McClements, 1998), independente do sal adicionado, sendo que este fato pode ser relacionado ao maior

número de ligações das moléculas de proteína disponíveis para interação com a água no sistema.

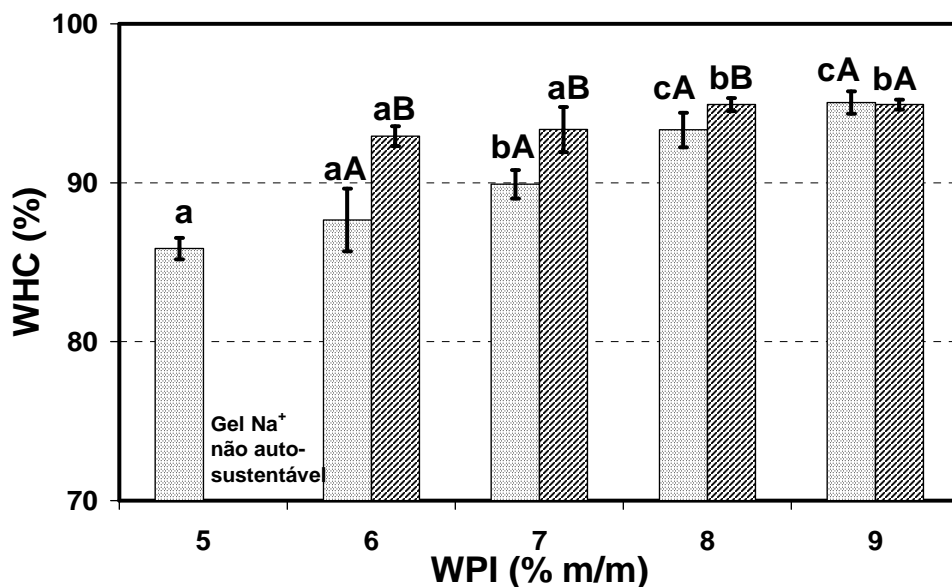
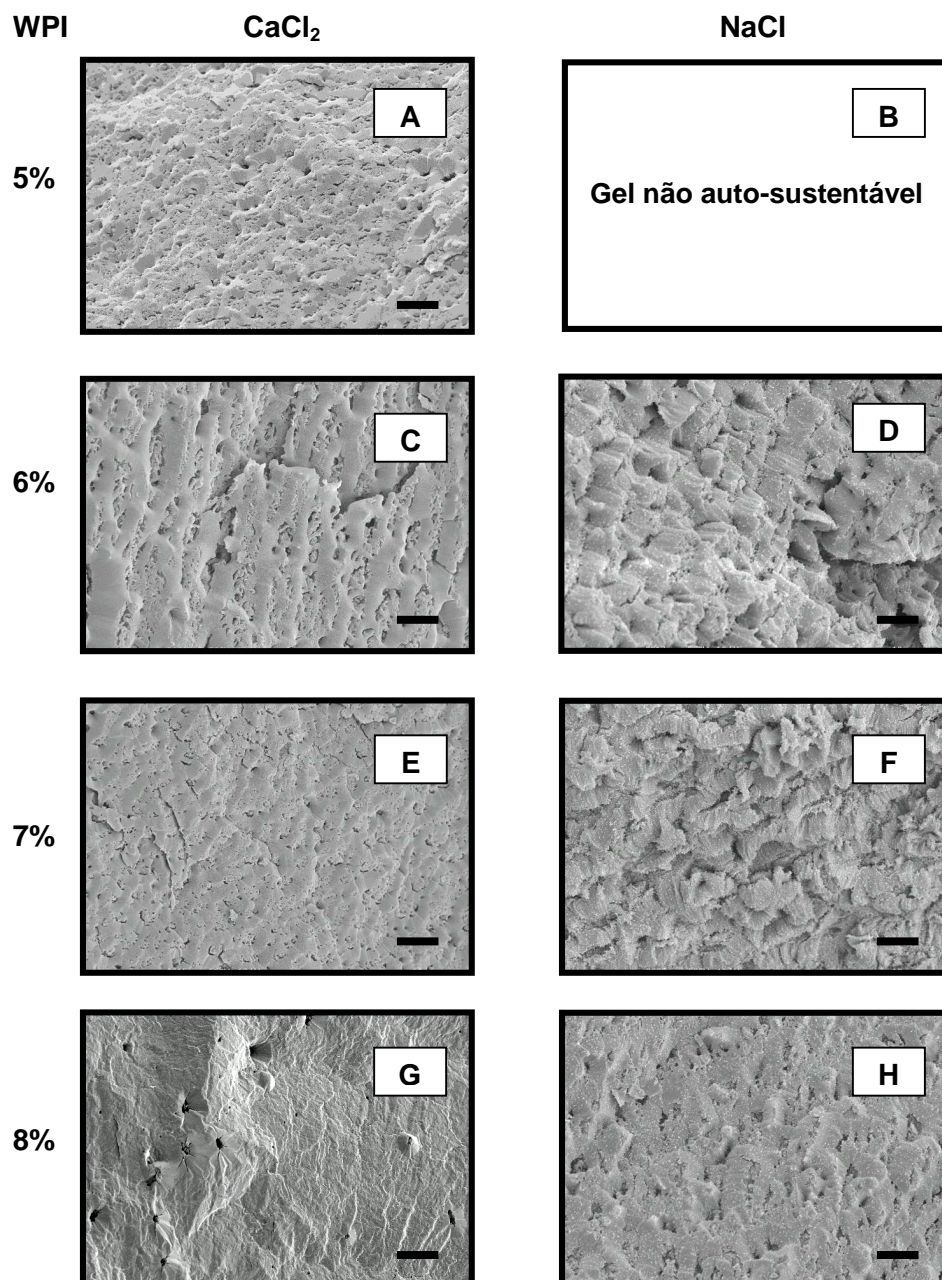


Figura 4.12. Capacidade de retenção de água (WHC) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 (▨) ou NaCl (▩) utilizando membranas de diálise. As barras representam o desvio padrão entre as replicatas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de proteína em cada sal estudado. Letras maiúsculas: diferenças entre os sais estudados na mesma concentração de proteína.

O cloreto de sódio levou a géis com maior capacidade de retenção de água que o cloreto de cálcio. Este resultado, assim como para as propriedades mecânicas, está associado ao tipo de interação feita pelos cátions de diferentes valências. Enquanto os divalentes formam pontes entre as cadeias de proteínas, deixando a água livre entre os poros da rede, os cátions monovalentes fazem a neutralização das cadeias, diminuindo a repulsão eletrostática, e atraindo as moléculas de água que ficam ao seu redor formando camadas de hidratação (Chandrasekaran et al., 1988).

4.7) Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A Figura 4.13 apresenta as microestruturas dos géis puros de proteínas do soro (WPI) em diferentes concentrações, 5, 6, 7, 8 e 9% (m/m) formados pela adição de sais de cálcio ou sódio (Figuras 4.13A, B, C, D, E, F, G, H, I e J).



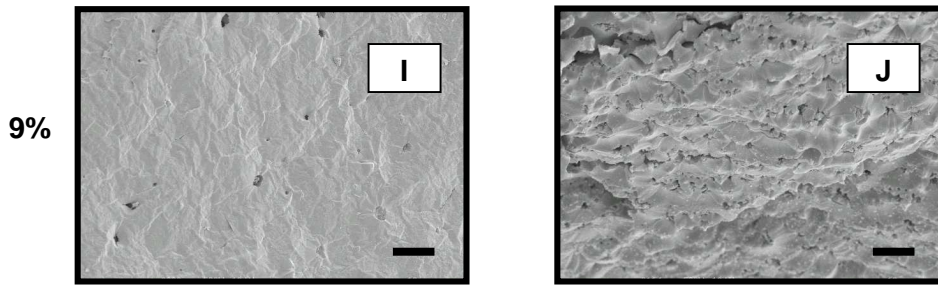


Figura 4.13. Micrografias SEM dos géis de WPI formados a frio pela difusão de sais de CaCl_2 (A, C, E, G, I) ou NaCl (B, D, F, H, J) utilizando membranas de diálise. A barra de escala corresponde a 10 μm .

Inicialmente, é possível observar que existe uma diferença entre as microestruturas com adição dos diferentes sais. A gelificação a frio induzida por sais de CaCl_2 (Figuras 4.13A, C, E, G e I) formou uma rede mais fina, compacta e pouco porosa. Com o aumento da concentração de WPI, observou-se a diminuição da quantidade de poros e redes com estruturas mais fechadas, o que justifica a maior retenção de água (Figura 4.12), o aumento nos valores de tensão na ruptura (Figura 4.8A) e do módulo de elasticidade (Figura 4.9). Para os géis de WPI formados pela adição de sais de NaCl (Figuras 4.13D, F, H e J), a rede formada apresentou-se mais porosa (maior descontinuidade), o que justifica a menor tensão na ruptura (Figura 4.8A) em relação aos géis de CaCl_2 . Nas maiores concentrações de WPI, observou-se estruturas mais homogêneas e com maior capacidade de retenção de água (Figura 4.12). A capacidade de retenção de água não está relacionada apenas com a porosidade dos géis, mas também com a característica dos polímeros, ou seja, a disponibilidade que eles têm em ligar-se com a água (Cavallieri et al., 2007), a qual foi dependente do tipo de sal adicionado.

Vardhanabhuti et al. (2001) avaliaram como a mistura, em diferentes razões, de agregados de proteínas solúveis desnaturadas (polímeros de WP) e proteínas do soro nativas alteraram o processo de gelificação térmica e as propriedades físicas dos géis

formados. Eles encontraram que aumentando a concentração de polímeros de WP aumentaram a tensão na ruptura dos géis, a capacidade de retenção de água, os géis se tornaram mais translúcidos e o tamanho dos poros da rede do gel diminuiu, tanto na presença de CaCl_2 (10 mM) quanto de NaCl (200 mM), resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

4.8) Avaliação da estrutura fractal dos géis de WPI

4.8.1) Determinação da dimensão fractal (D_f) através de um modelo mecânico

A Figura 4.14 (A e B) apresenta as curvas tensão (σ)-deformação (ϵ_H) obtidas através da compressão das amostras até aproximadamente 60% da altura inicial dos géis de WPI formados pela indução de CaCl_2 e NaCl , respectivamente.

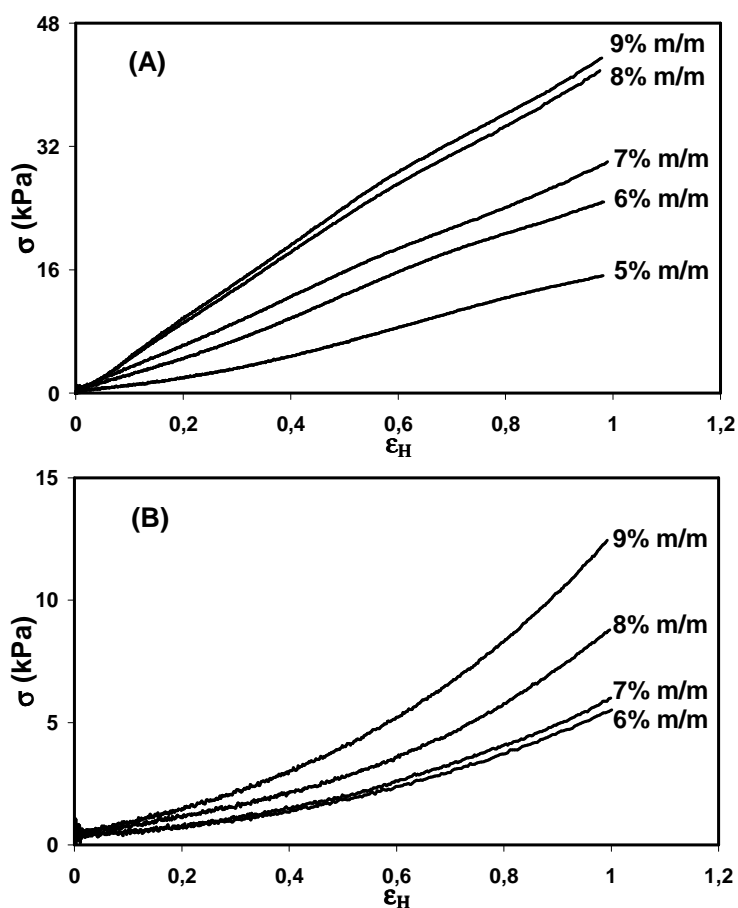


Figura 4.14. Curvas tensão (σ)-deformação (ϵ_H) para os géis de WPI formados a frio, em diferentes concentrações, através da difusão de sais de (A) CaCl_2 ou (B) NaCl em membranas de diálise.

Após a determinação do limite de linearidade (γ_0) dos géis, foram construídos os gráficos de γ_0 em função da concentração de WPI (% m/m) em escala logarítmica (Figuras 4.15A e B, respectivamente). Segundo Shih et al. (1990), γ_0 tende a diminuir com o aumento da concentração de proteína para os géis de ligação forte e tende a aumentar com a concentração para os géis de ligação fraca. Portanto, observando-se a Figura 4.15 (A e B), pode-se dizer que, independente do sal, os géis mostraram comportamento de ligação fraca, o que indica que os flocos fractais que formam a estrutura dos géis são mais rígidos do que as ligações entre os flocos, ou seja, prevalecem as ligações intrafloculares.

Pelo modelo de Wu & Morbidelli (2001), fazendo-se a consideração de que $\alpha = 1$ (gel de ligação fraca) para os géis de WPI, tem-se $\beta = 1$ (Equação 11) e a versão simplificada $A = 1 / (3 - D_f)$ (Equação 9). Com isto, D_f pode ser diretamente calculado pela inclinação (A) da curva logarítmica do módulo de elasticidade (E-kPa) em função da concentração de WPI (% m/m) (Figuras 4.15C e D).

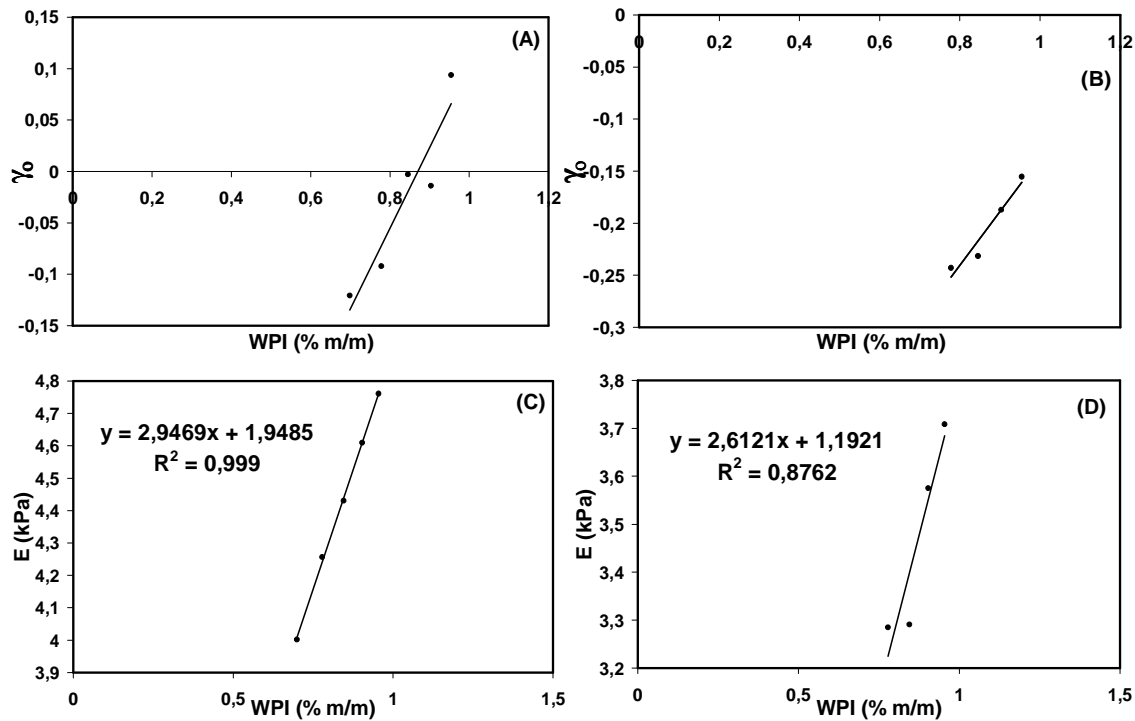


Figura 4.15. Limite de linearidade (γ_0) e módulo de elasticidade (E) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de (A, C) CaCl_2 ou (B, D) NaCl em membranas de diálise em função da concentração de proteína.

Utilizando a Equação 9 (item 3.3.1.1.2), os valores de D_f calculados foram os seguintes: 2,66 e 2,62 para os géis de WPI formados através da adição de CaCl_2 e NaCl , respectivamente. Marangoni et al. (2000), utilizando o modelo reológico de Shih et al. (1990), encontraram para os géis de proteínas do soro induzidos por sais de cálcio e de sódio valores de dimensão fractal média de 2,63 e de 2,45, respectivamente.

4.8.2) Determinação da dimensão fractal (D_f) através da análise de imagem SEM

Na Figura 4.16, pode-se observar um exemplo de uma micrografia transformada em imagem binária (preto e branco) durante a análise de imagem, realizada para determinar a dimensão fractal dos géis pelo método de contagem de caixas. Em todos os géis avaliados, os espaços vazios entre os agregados de proteína foram marcados como regiões negras nas imagens binárias, definindo assim as estruturas como *foreground*

(pixels brancos) e as cavidades como *background* (pixels pretos), conforme pode ser observado na Figura 4.16B.

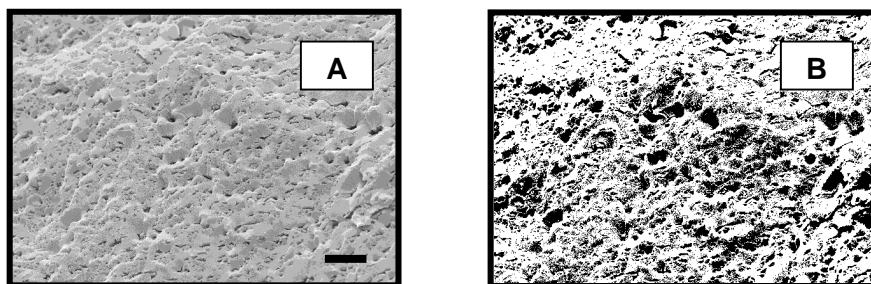


Figura 4.16. Micrografia SEM (A) e correspondente imagem binária (B) do gel de WPI (5% m/m) formado a frio pela difusão de CaCl_2 em membrana de diálise. A barra de escala corresponde a 10 μm .

As médias de dimensão fractal (D_f) após aplicar o método de contagem de caixas para as imagens binárias das micrografias SEM de diferentes sistemas de WPI estão apresentadas na Figura 4.17.

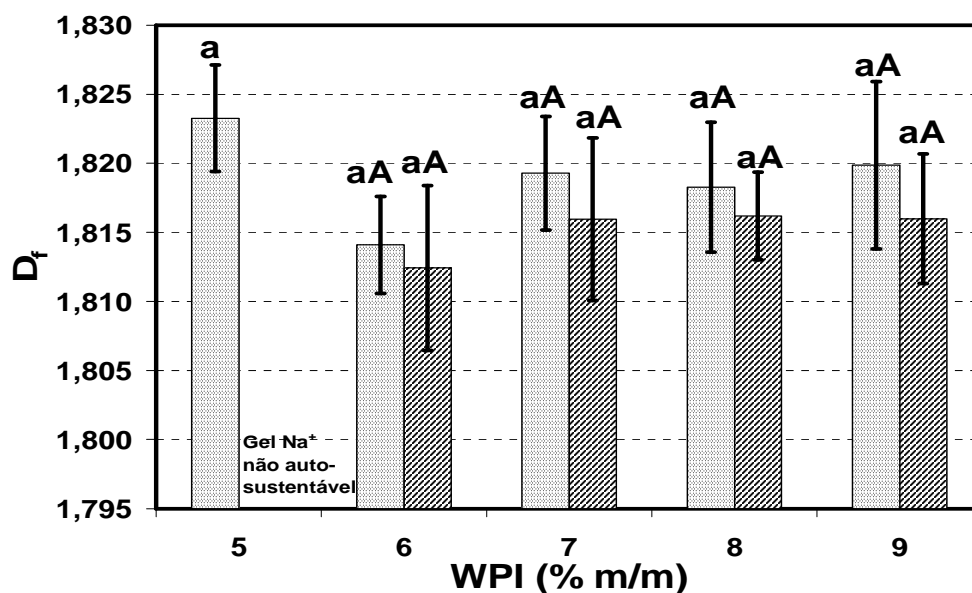




Figura 4.17. Dimensão fractal (D_f) dos géis de WPI formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 () ou NaCl () utilizando membranas de diálise. As barras representam o desvio padrão referentes a 10 imagens em 30 posições de grade. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de proteína em cada sal estudado. Letras maiúsculas: diferenças entre os sais estudados na mesma concentração de proteína.

Analisando-se a Figura 4.17, observa-se que os resultados de D_f apresentaram um desvio padrão alto que pode ser explicado pelo fato de que em cada condição estudada analisou-se 10 imagens, sendo cada imagem avaliada em 30 posições de grade diferentes, onde os resultados variaram bastante como consequência das variadas estruturas entre uma posição e outra. Assim, de maneira geral, os valores de D_f dos géis puros de proteínas do soro (WPI) não foram influenciados ($p>0,05$) pela valência do sal adicionado em cada formulação e pela concentração de WPI em cada sistema (NaCl ou CaCl_2) (Figura 4.17). A dimensão fractal (D_f) dos géis variou entre 1,81 e 1,82, o que indica um alto grau de complexidade fractal em todos os sistemas. Marangoni et al. (2000) investigaram a estrutura dos géis induzidos por NaCl e CaCl_2 de proteínas do soro desnaturadas termicamente através da análise de fractal da microestrutura do gel. Os resultados indicaram que o tamanho dos agregados aumentou com aumento da concentração de CaCl_2 , enquanto que o NaCl não alterou a dimensão fractal dos géis, sendo as dimensões fractais dos géis formados com a adição de CaCl_2 maiores do que os formados com a adição de NaCl, o que não foi observado neste trabalho.

Como medida de comparação destes resultados com os obtidos através do modelo mecânico, considerou-se, em uma escala tridimensional (Equação 18), o valor médio de D_f entre todas as concentrações de WPI para os géis formados através da adição de CaCl_2 e NaCl, sendo de 2,82, aproximadamente.

4.8.3) Comparação dos valores de D_f obtidos em função das propriedades elásticas e da SEM

Analisando-se os valores de D_f obtidos por ambos os métodos, observa-se que eles foram semelhantes, sendo as dimensões fractais obtidas pela análise de imagem SEM (2,82) ligeiramente maiores que as obtidas através do modelo mecânico (2,66 e 2,62). O fato dos valores de D_f estarem compreendidos entre 2,62 e 2,82 confirma a idéia

de que os géis apresentam comportamento de ligação fraca, pois altos valores de D_f (2,6 – 2,8) são esperados para estes tipos de géis (Wu & Morbidelli, 2001).

Para confirmar os resultados obtidos através do modelo mecânico, os valores de D_f determinados pela análise de imagem SEM foram substituídos na Equação 9 (item 3.3.1.1.2). O parâmetro β foi então calculado e substituído na Equação 11 (item 3.3.1.1.2). Assumindo um valor de x igual a 1,3 (Wu & Morbidelli, 2001), α foi calculado. Este parâmetro, que apresenta valores pertos de 1 para os géis de ligação fraca, foi determinado como 1,14 e 1,16 para os géis de WPI formados a frio através da adição de sais de CaCl_2 e NaCl , respectivamente. Contudo, como um valor de α maior do que 1 não é teoricamente possível, Wu & Morbidelli (2001) consideraram isto como um desvio normal na determinação da D_f pelo modelo mecânico. Desta maneira, os resultados provam mais uma vez a natureza de ligação fraca dos géis de WPI, que foi assumida no modelo.

Hagiwara et al. (1997a) confirmaram que os géis de BSA e β -lactoglobulina preparados com e sem a adição de CaCl_2 mostraram comportamento de ligação fraca e forte, respectivamente. Os valores de D_f obtidos foram de aproximadamente 2 para os géis de ligação forte e de aproximadamente 2,7 para os géis de ligação fraca. Para os géis de β -lactoglobulina contendo CaCl_2 (ligação do tipo fraca), os autores avaliaram também a dimensão fractal através da análise de imagem obtida pela microscopia confocal, sendo os valores obtidos perto dos encontrados pelas medidas de elasticidade dos géis.

Dávila & Parés (2007) utilizaram o modelo mecânico de Wu & Morbidelli (2001) para calcular a dimensão fractal (D_f) de géis de proteínas do plasma em pH 5,0, 6,0 e 7,0 e encontraram valores de D_f entre 2,63 e 2,70. Enquanto isso, utilizando a microscopia eletrônica de varredura (SEM), através do método de contagem de caixas, a D_f

encontrada variou de 2,78 a 2,83. Hagiwara et al. (1998) encontraram para os géis de BSA valores de D_f entre 2,60 e 2,80 com influência do tampão utilizado para preparar as soluções de proteína. A dimensão fractal foi avaliada pelo método reológico de Shih et al. (1990) e pela análise de imagem obtida pela microscopia confocal, sendo os resultados muito semelhantes. Os géis de BSA mostraram comportamento de ligação fraca, ou seja, o limite de linearidade (γ_0) aumentou com o aumento da concentração de BSA. Marangoni et al. (2000) também provaram a validade do modelo através da microscopia eletrônica de transmissão (TEM), confirmando que os géis de proteínas do soro apresentaram comportamento de ligação fraca.

Assim, os resultados confirmaram a aplicabilidade da análise fractal por métodos macroscópicos e microscópicos para descrever os géis de WPI, demonstrando que o comportamento elástico é um reflexo da estrutura fractal dos agregados nos géis. Através do modelo mecânico, pode-se determinar a natureza de ligação fraca dos géis de WPI, o que implica em dizer que as ligações intrafloculares, formadas na etapa de aquecimento, foram mais rígidas do que as ligações interfloculares, promovidas pela adição de sais. Este comportamento é corroborado pelo encontrado por Alting et al. (2003a). Segundo os autores, as ligações dissulfídicas entre os agregados protéicos são formadas principalmente na etapa de aquecimento sendo elas, em grande parte, responsáveis pelas características de resistência mecânica da rede protéica formada.

CAPÍTULO 4. Resultados e Discussão

Parte 3. Influência da adição do polissacarídeo da linhaça sobre a gelificação a frio das proteínas do soro

4.9) Estudo de separação de fases

A solução escolhida para o estudo de separação de fases em provetas graduadas foi 7% (m/m) de isolado protéico de soro (WPI) e 0,4% (m/m) de polissacarídeo da linhaça (FG), pois inicialmente tinha-se a idéia de estudar o ponto médio da concentração de WPI estudada nos géis puros (7% m/m) e o ponto médio da concentração de FG que iria ser estudada nos géis mistos (0,4% m/m). As soluções bipoliméricas foram preparadas conforme item 3.2.4, porém sem a adição de sais, e armazenadas a 10°C por um período de 72 horas. A Figura 4.18 (A, B e C) apresenta as mudanças observadas visualmente nas soluções bipoliméricas durante o período de armazenamento.

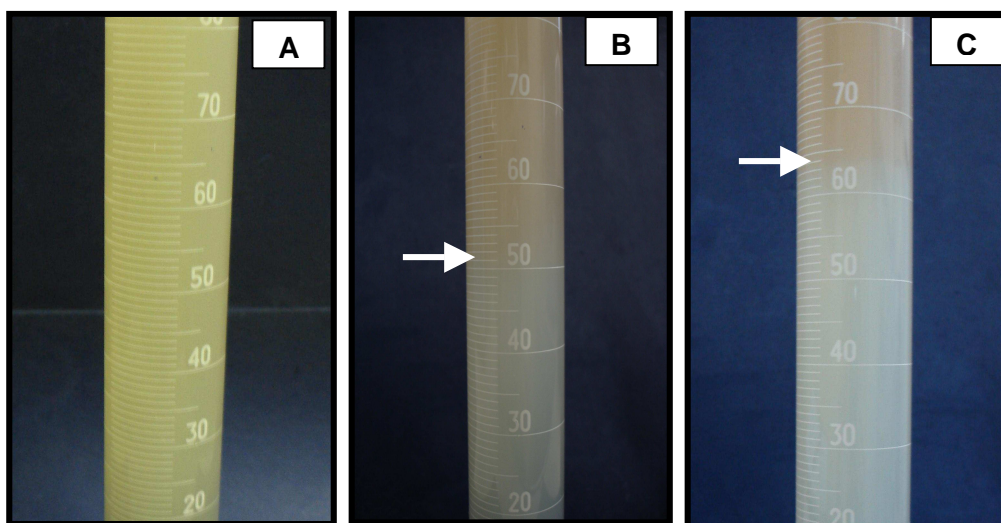


Figura 4.18. Aspecto visual dos sistemas formados por soluções de WPI (7% m/m)–FG (0,4% m/m) sem a adição de sais após (A) 0 horas, (B) 24 horas e (C) 72 horas de armazenamento. As setas indicam a separação de fases.

Após um determinado período de tempo, as soluções bipoliméricas começaram a se desestabilizar resultando na formação de duas fases distintas. Conforme Figura 4.18, os sistemas apresentaram separação de fases a partir de 24 horas de armazenamento a 10°C. Após 72 horas, as fases formadas foram então cuidadosamente retiradas com o uso de pipetas e armazenadas para análises. Finalmente, solução inicial (imediatamente após o preparo), fase superior e fase inferior tiveram a sua composição caracterizada

através da determinação de proteína pelo Método de Kjeldahl (AOAC, 1997) (fator proteína-nitrogênio de 6,38). A concentração de proteína determinada foi de $6,77 \pm 0,33\%$ para a solução inicial, $2,82 \pm 0,02\%$ para a fase superior (rica em polissacarídeo) e $8,86 \pm 0,01\%$ para a fase inferior (rica em proteína) dos sistemas. Para verificar o balanço de massa dos sistemas, determinou-se a quantidade de proteína existente em cada fase a partir do volume ocupado por cada uma na proveta. Considerou-se a densidade de cada fase igual a 1 g/cm^3 , visto que a maior parte do sistema é composta por água. Sendo assim, a quantidade de proteína determinada na solução inicial e nas fases superior e inferior está apresentada na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Quantidade de proteína da solução inicial e das fases superior e inferior dos sistemas.

	Proteína (%)	V_{ocupado} (mL)	Massa Total (g)	Massa de Proteína (g)	Soma das fases
Solução Inicial*	6,77	100	100	6,77	-
Fase Superior**	2,82	35,5	35,5	1,00	6,71
Fase Inferior**	8,86	64,5	64,5	5,71	

Estes valores são a média de dois ensaios.

* Imediatamente após o preparo dos sistemas.

** Após 72 horas de armazenamento.

Analisando-se a Tabela 4.5, observa-se que a quantidade de proteína determinada para as fases superior e inferior totalizou 6,71%, resultado semelhante ao encontrado para a solução inicial (6,77%). Dessa forma, pode-se dizer que a concentração de proteína obtida a partir da análise química está de acordo com o balanço de massa para este componente.

As soluções foram avaliadas também através de microscopia de fluorescência, sendo a microestrutura do sistema inicial e das fases separadas após 72 horas apresentada na Figura 4.19.

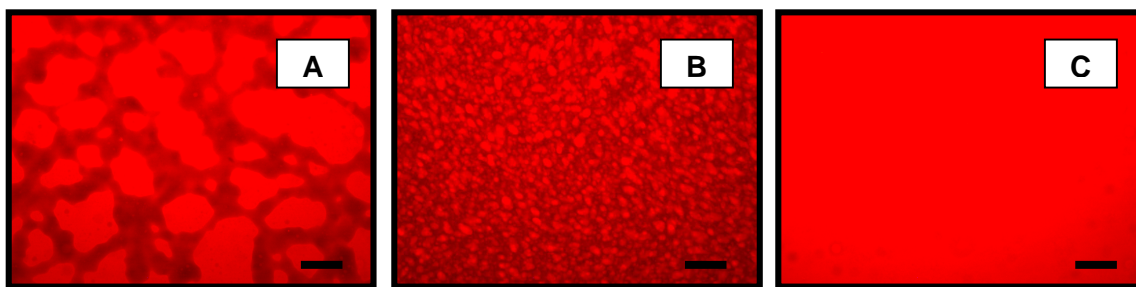


Figura 4.19. Microestrutura por fluorescência dos sistemas WPI (7% m/m)–FG (0,4% m/m). (A) Solução inicial, (B) fase superior e (C) fase inferior. A barra de escala corresponde a 100 μm .

A composição destes sistemas pode ser relacionada com a microestrutura obtida através de microscopia de fluorescência (Figura 4.19), sendo as regiões mais claras das imagens correspondentes à presença de proteína, enquanto que as regiões mais escuras indicaram a ausência de proteína, já que o corante Rodamina B foi utilizado para marcar este último biopolímero. Desta forma, a solução inicial apresentou uma estrutura composta por agregados protéicos dispersos em uma fase contínua rica em polissacarídeo (Figura 4.19A) e a fase superior apresentou uma estrutura semelhante, porém os agregados protéicos estavam presentes em menor quantidade e no formato de pequenas gotas (Figura 4.19B). No entanto, a fase inferior apresentou microestrutura bastante homogênea com praticamente nenhuma gotícula inclusa formada por polissacarídeo (Figura 4.19C).

Comparando os resultados de composição química e microscopia das fases separadas, pode-se concluir que este sistema WPI – FG não apresentou uma completa micro-separação de fases espontânea, pois a fase superior apresentou pequenos agregados protéicos dispersos, e para que o equilíbrio entre as fases seja alcançado, é necessário que ambas as fases estejam livres de qualquer inclusão. Bourriot et al. (1999) também encontraram micro-separação de fases na solução inicial para o sistema caseína (3% m/m) – guar (0,2% m/m), sendo a fase contínua rica em proteína e a fase dispersa rica em polissacarídeo. Em baixa concentração de jataí (LBG) (0,2% m/m), o sistema WPI

– LBG apresentou uma fase dispersa rica em polissacarídeo constituída de pequenas gotículas esféricas e uma fase contínua rica em proteína, porém com o aumento da concentração (0,6% m/m), as gotículas dispersas passaram a combinar-se e originaram uma nova fase contínua rica em polissacarídeo (Tavares et al., 2005). De Jong & Van de Velde (2007) encontraram comportamento semelhante, com inversão de fases na concentração de 0,3% (m/m) LBG.

4.10) Construção de diagrama de fases

A partir do estudo de separação de fases das soluções WPI (7% m/m)–FG (0,4% m/m) (item 4.9), observou-se que nestas concentrações existe incompatibilidade termodinâmica entre estes dois biopolímeros. Com isso, optou-se por realizar um estudo de diagramas de fases visual de géis WPI – FG formados a frio pela adição de sais de cálcio ou sódio ($\mu = 150$) (Figura 4.20) para encontrar a região ou as concentrações em que ocorresse gelificação e que não houvesse separação de fases macroscópica. Para a construção destes diagramas, foram preparadas diversas soluções mistas contendo diferentes concentrações de proteína e polissacarídeo, conforme descrito no item 3.2.4.1. Através de observações visuais pode-se então avaliar quais sistemas mostraram separação de fases e quais apresentaram gelificação.

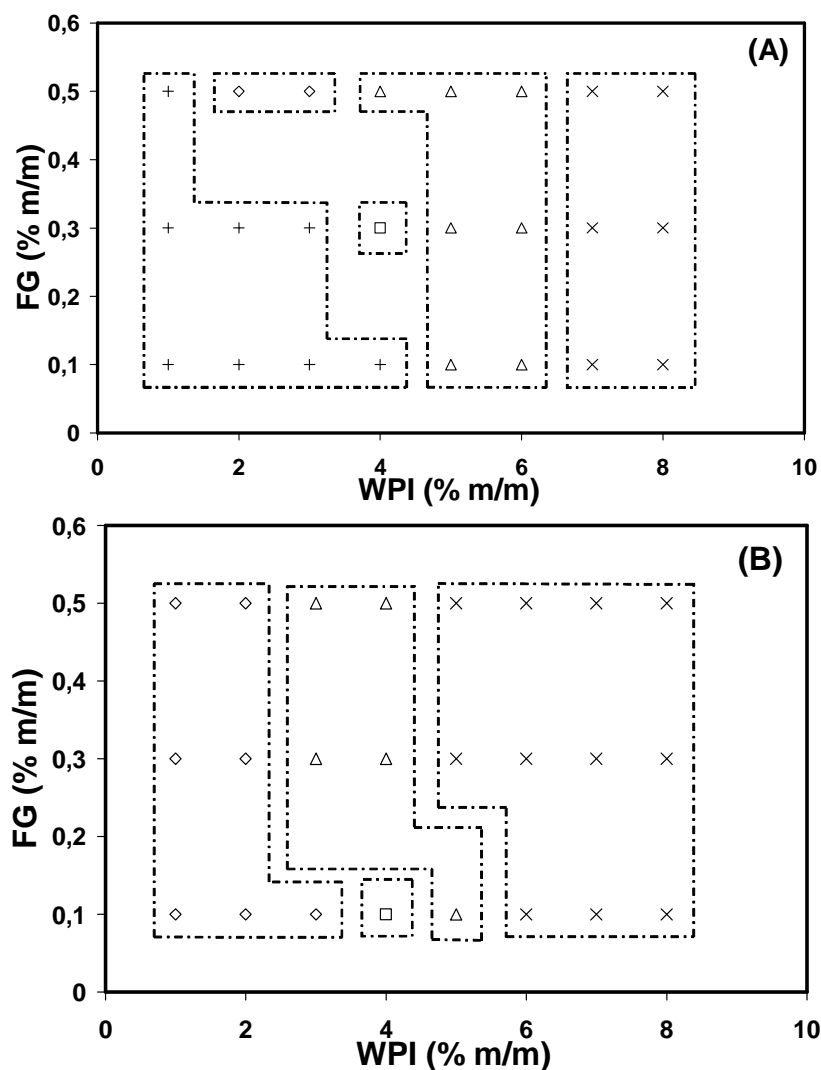


Figura 4.20. Diagrama visual de fases para os géis WPI – FG formados a frio pela adição direta de sais de (A) CaCl_2 ou (B) NaCl . (x) Região monofásica gelificada, (Δ) região monofásica com gel não auto-sustentável, (\diamond) região monofásica não gelificada, (\square) região de 2 fases com gel não auto-sustentável e (+) região de 2 fases não gelificada. A linha pontilhada representa as regiões formadas.

De uma maneira geral, pode-se notar que o diagrama construído com a adição de CaCl_2 , apresentou uma maior região com separação de fases macroscópica quando comparado com aquele construído com a adição de NaCl . Os diagramas de fases construídos sob essas diferentes condições puderam ser divididos em duas regiões distintas do ponto de vista macroscópico: região homogênea (1 fase gel, 1 fase gel não

auto-sustentável ou 1 fase não gelificada) e região heterogênea (2 fases gel não auto-sustentável ou 2 fases não gelificadas). Para os sistemas com adição de sais de cálcio (Figura 4.20A), em relativamente baixas concentrações de WPI e FG, não ocorreu gelificação e as soluções apresentaram separação de fases macroscópica, com a formação de uma fase superior mais translúcida rica em polissacarídeo e uma fase inferior mais opaca e esbranquiçada rica em proteína. O aumento das concentrações dos biopolímeros resultou na formação de géis auto-sustentáveis com uma única fase homogênea. Já para os sistemas com adição de sais de sódio (Figura 4.20B), em baixas concentrações dos biopolímeros, não ocorreu gelificação e as soluções resultaram na formação de uma única fase homogênea e com o aumento nas concentrações, resultou na formação de uma fase gel homogênea.

Como para ambos os sais estudados, as misturas contendo 7 ou 8% (m/m) de WPI, nas três concentrações de polissacarídeo, formaram géis auto-sustentáveis e se encontraram na região macroscopicamente homogênea do diagrama de fases, optou-se por estudar a gelificação bipolimérica na maior concentração de proteína (8% m/m).

4.11) Géis bipoliméricos

Para a avaliação da influência da adição do polissacarídeo da linhaça (FG) sobre a gelificação a frio das proteínas do soro (WPI) foram estudados sistemas contendo concentração fixa de WPI (8% m/m) e variada de FG (0; 0,1; 0,3 e 0,5% m/m) utilizando dois diferentes métodos de preparo dos géis, a adição direta de sais (CaCl_2 ou NaCl) nas soluções obtidas da mistura de soluções estoque (proteínas e polissacarídeo), conforme descrito no item 3.2.4.1, e a gelificação por difusão utilizando membranas de diálise (item 3.2.4.2).

4.11.1) Adição direta de sais

4.11.1.1) Análise visual

Através da análise visual, foi possível observar que a adição de diferentes sais ($\mu = 150$) levou à formação de sistemas distintos. A Figura 4.21 (A e B) apresenta géis 8% WPI-0,5% FG formados pela adição direta de sais de cálcio e 8% WPI-0,3% FG formados pela adição direta de sais de sódio, respectivamente. Como pode-se observar, os géis bipolímeros de CaCl_2 apresentaram-se bastante opacos (esbranquiçados), enquanto os géis de NaCl formaram uma rede translúcida. Nas três concentrações de polissacarídeo, os géis bipolímeros formados com a adição direta de sais de cálcio (Figura 4.21A) ficaram auto-sustentáveis, porém bem mais frágeis que os géis formados com a adição de sais de sódio (Figura 4.21B). Aparentemente, nenhum dos géis apresentou separação de fases macroscópica.

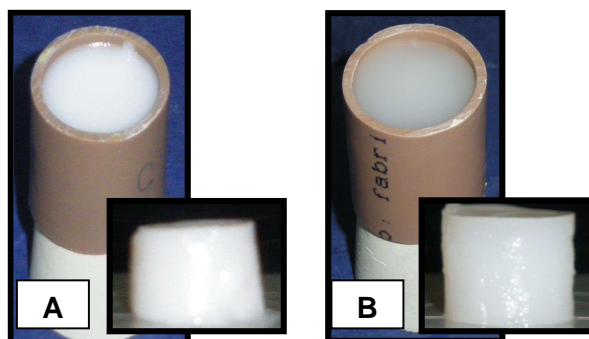


Figura 4.21. Géis WPI – FG formados a frio através da adição direta de sais. (A) 8%WPI-0,5%FG – CaCl_2 e (B) 8%WPI-0,3%FG – NaCl. O detalhe mostra os géis removidos dos recipientes cilíndricos.

4.11.1.2) Propriedades mecânicas

A Figura 4.22 mostra as propriedades mecânicas dos géis bipolímeros formados através da adição direta de sais de cálcio ou sódio em função da concentração de polissacarídeo da linhaça (% m/m de FG) adicionada à solução de proteínas do soro (8% m/m de WPI). O gel 8% WPI-0% FG não foi avaliado, pois com a adição direta dos sais,

observou-se a formação de grumos de proteína e a gelificação instantâneas (gel bastante heterogêneo), o que impediu a agitação do sistema.

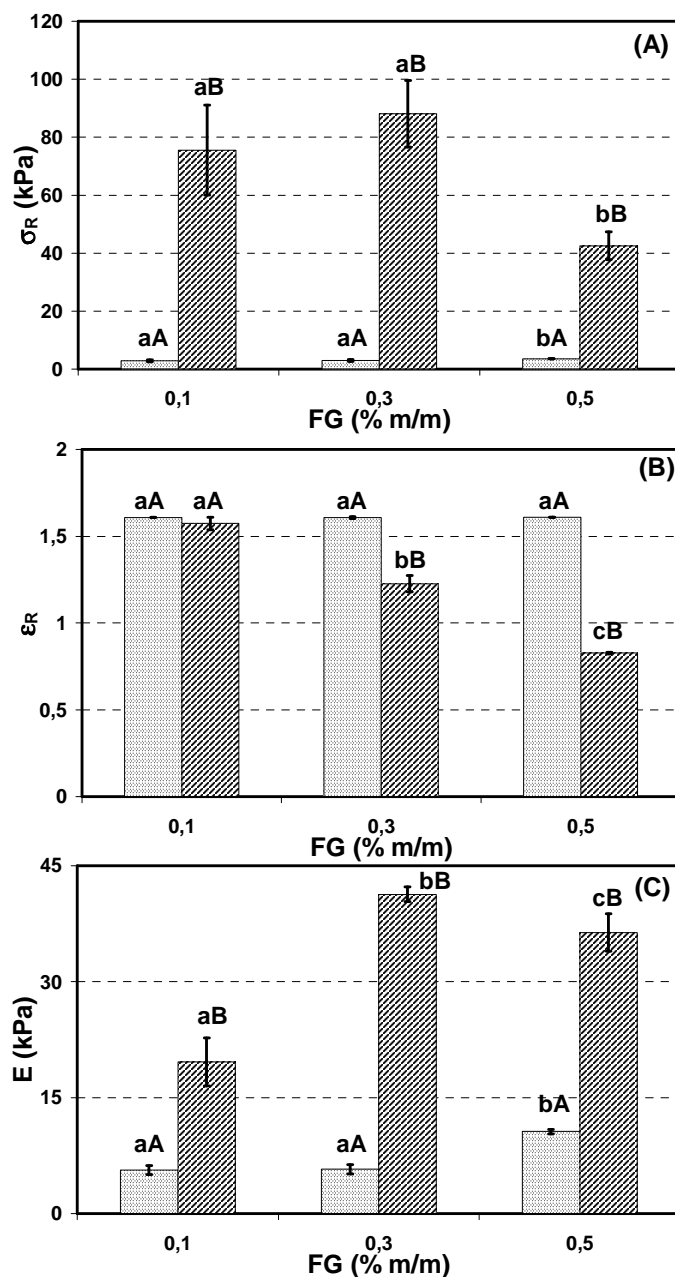


Figura 4.22. Propriedades mecânicas dos géis WPI – FG formados a frio através da adição direta de sais de CaCl₂ (□) ou NaCl (▨). (A) Tensão na ruptura (σ_R), (B) Deformação na ruptura (ϵ_R) e (C) Módulo de elasticidade (E). As barras representam o desvio padrão entre as replicatas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de polissacarídeo em cada sal estudado. Letras maiúsculas: diferenças entre os sais estudados na mesma concentração de polissacarídeo.

De acordo com a Figura 4.22A, observa-se que os géis bipoliméricos formados através da adição direta de sais de cálcio apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores de tensão na ruptura apenas com a adição de 0,5% (m/m) de polissacarídeo. Por outro lado, os géis formados pela adição de sais de sódio apresentaram diminuição ($p < 0,05$) na rigidez nesta mesma concentração de FG. Os géis induzidos por cloreto de sódio mostraram valores de tensão na ruptura bem superiores aos induzidos por cloreto de cálcio, o que pode ser explicado pela estrutura bastante frágil formada neste último caso, como já descrito no item 4.11.1.1. Este resultado pode ter sido consequência da quebra na estrutura do gel, pois quando o cálcio é adicionado, ele forma pontes entre os agregados carregados negativamente, e a agitação pode ter levado à ruptura destas pontes. Os géis bipoliméricos de CaCl_2 apresentaram valores de deformabilidade (ϵ_R) maiores ($p < 0,05$) do que os géis de NaCl nas concentrações de 0,3 e 0,5% (m/m) de FG (Figura 4.22B). O aumento da concentração de FG levou a uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na deformabilidade dos géis com adição de cloreto de sódio, enquanto que os géis com adição de cloreto de cálcio não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) com o aumento na concentração de polissacarídeo. Com relação aos resultados obtidos para o módulo de elasticidade (Figura 4.22C), uma tendência similar à da tensão na ruptura foi observada, confirmando o caráter mais rígido da estrutura formada pelo sal de cátion monovalente.

A gelificação a frio através da adição direta de sais pode ser considerada como um processo rápido, que está associado ao aumento da interação proteína-proteína. Cavallieri (2007) avaliou a microestrutura e propriedades reológicas de géis de proteínas do soro (5% m/m) formados a frio utilizando altas taxas de acidificação devido ao aumento da concentração de glucona- δ -lactona (GDL) adicionada. No pH final de 4,2, observou-se que o aumento na adição de goma guar de 0,1 para 0,3% (m/m) resultou em géis mais fortes, elásticos e menores valores de dimensão fractal, porém com a adição de 0,5%

(m/m) os géis foram não auto-sustentáveis. De acordo com o autor, em menores pHs, as interações proteína-proteína são favorecidas, mas em maior concentração de guar parece haver uma inversão de fases, pois a presença do polissacarídeo obstruiu a formação da rede de proteína. Observou-se no presente trabalho, comportamento semelhante ao encontrado por Cavallieri (2007), com a diferença de que na maior concentração de FG (0,5% m/m) obteve-se um gel auto-sustentável. Esta diferença pode estar relacionada ao fato de que, enquanto a guar é um polissacarídeo neutro, a goma de linhaça, além da fração neutra, possui uma fração negativamente carregada, o que faz com que ela possa interagir com a proteína. No entanto, na presença de NaCl, o gel (8% WPI-0,5% FG) apresentou uma redução na força e elasticidade em relação aos géis com menores concentrações de FG, o que pode ser devido a uma maior incompatibilidade e provável micro-separação de fases. Segundo De Jong & Van de Velde (2007), que estudaram a influência de diferentes polissacarídeos (neutros e aniônicos) na gelificação a frio de proteínas do soro através da acidificação com GDL (pH final fixo em 4,8), em baixas concentrações de polissacarídeos neutros (guar e LBG), a microestrutura dos géis é caracterizada pela micro-separação de fases dentro de uma rede contínua de proteína. Com o aumento da concentração, a micro-separação de fases se tornou mais pronunciada, ocorrendo uma inversão de fases para um gel contínuo de polissacarídeo e diminuindo a elasticidade e a tensão na ruptura dos géis mistos, o que está de acordo com o encontrado neste trabalho para os géis com adição de cloreto de sódio.

Após esta determinação, verificou-se que não seria possível realizar as demais medidas (WHC e SEM), pois os géis WPI – FG formados pela adição de sais de cálcio eram muito frágeis e rompiam durante a manipulação. No entanto, estas análises foram realizadas para os mesmos sistemas formados através da difusão de sais utilizando membranas de diálise.

4.11.2) Membranas de diálise

4.11.2.1) Análise visual

Os géis puros de WPI apresentaram-se homogêneos e auto-sustentáveis com a difusão em sais de cálcio ou sódio ($\mu = 150$) e tiveram uma aparência opaca (rede desordenada) e translúcida (rede ordenada), respectivamente (item 4.3). A adição de polissacarídeo à solução de WPI antes do processo de difusão levou à formação de géis com aparência distinta das observadas para os géis puros de WPI (Figuras 4.23A, B, C, D, E e F).

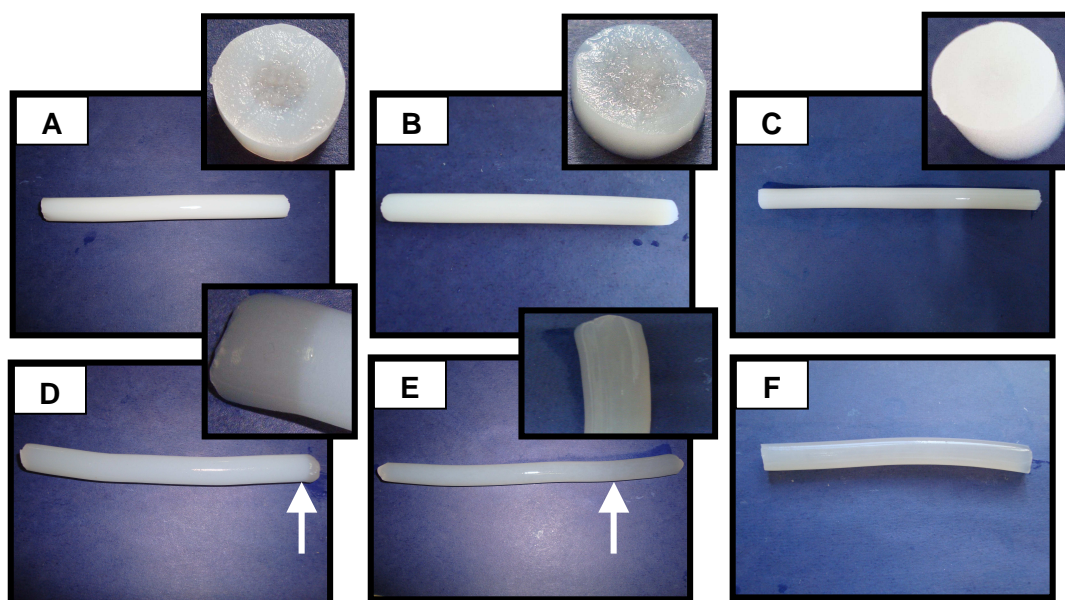


Figura 4.23. Géis WPI – FG formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 (A, B e C) e NaCl (D, E e F) utilizando membranas de diálise. (A, D) 8% WPI-0,1% FG, (B, E) 8% WPI-0,3% FG e (C, F) 8% WPI-0,5% FG. As setas e o detalhe mostram a separação de fases dos géis.

Antes da remoção dos géis das membranas de diálise, os géis bipolímeros formados pela adição de sais de cálcio contendo 0,1% (m/m) de polissacarídeo aparentemente não apresentavam separação de fases, pois tinham aparência homogênea, opaca e esbranquiçada. Os géis contendo 0,3 e 0,5% (m/m) de polissacarídeo eram menos esbranquiçados e com separação pouco visível (Figuras

4.23A, B e C, respectivamente). Para os géis formados pela adição de sais de sódio (translúcidos) contendo 0,1 e 0,3% (m/m) de polissacarídeo, a formação de duas fases foi claramente observada dentro da membrana, enquanto que no gel com adição de 0,5% (m/m) de FG não era nítida a separação de fases (Figuras 4.23D, E e F, respectivamente). Após a remoção dos géis das membranas e corte dos mesmos, foi possível observar uma separação de fases no sentido radial dos géis bipolímeros de CaCl_2 (Detalhe das Figuras 4.23A, B e C).

A gelificação e a separação de fases ocorreram simultaneamente. No caso da difusão com sais de cálcio, acredita-se que este sal, ao difundir-se lentamente, atuou como uma ponte entre os grupos negativamente carregados promovendo a gelificação instantânea. Ao mesmo tempo, ocorreu a separação de fases, sendo que a fase menos densa (polissacarídeo) migrou para o centro, sendo mantidas as ligações proteína-polissacarídeo através das ligações cruzadas dos cátions divalentes. Já para os géis de NaCl , a competição entre os dois processos, gelificação e separação de fases, resultou na formação de duas camadas de gel, uma rica em proteína e a outra rica em polissacarídeo (Detalhe das Figuras 4.23D e E).

Com a separação de fases, tinha-se a necessidade de analisar os géis em cada uma das fases. No entanto, devido à falta de reprodutibilidade nos ensaios da fase superior, que era muito pequena, optou-se por realizar os ensaios macroscópicos de determinação das propriedades mecânicas e capacidade de retenção de água com amostras das duas fases. Porém, para o ensaio de microscopia eletrônica de varredura (SEM), foi possível avaliar cada fase dos géis (superior e inferior), visto que esta análise exige uma pequena quantidade de amostra. A fase superior correspondeu à extremidade do gel que estava na parte superior quando a membrana contendo o gel foi retirada da solução salina e a fase inferior correspondeu à outra extremidade do gel.

4.11.2.2) Propriedades mecânicas

Na Figura 4.24 estão apresentadas as propriedades mecânicas correspondentes à tensão e deformação na ruptura e módulo de elasticidade (Figuras 4.24A, B e C, respectivamente) dos géis bipoliméricos formados a frio pela difusão de sais de cálcio ou sódio utilizando membranas de diálise, em função da concentração de polissacarídeo da linhaça (% m/m de FG) adicionada à solução de proteínas do soro (8% m/m de WPI).

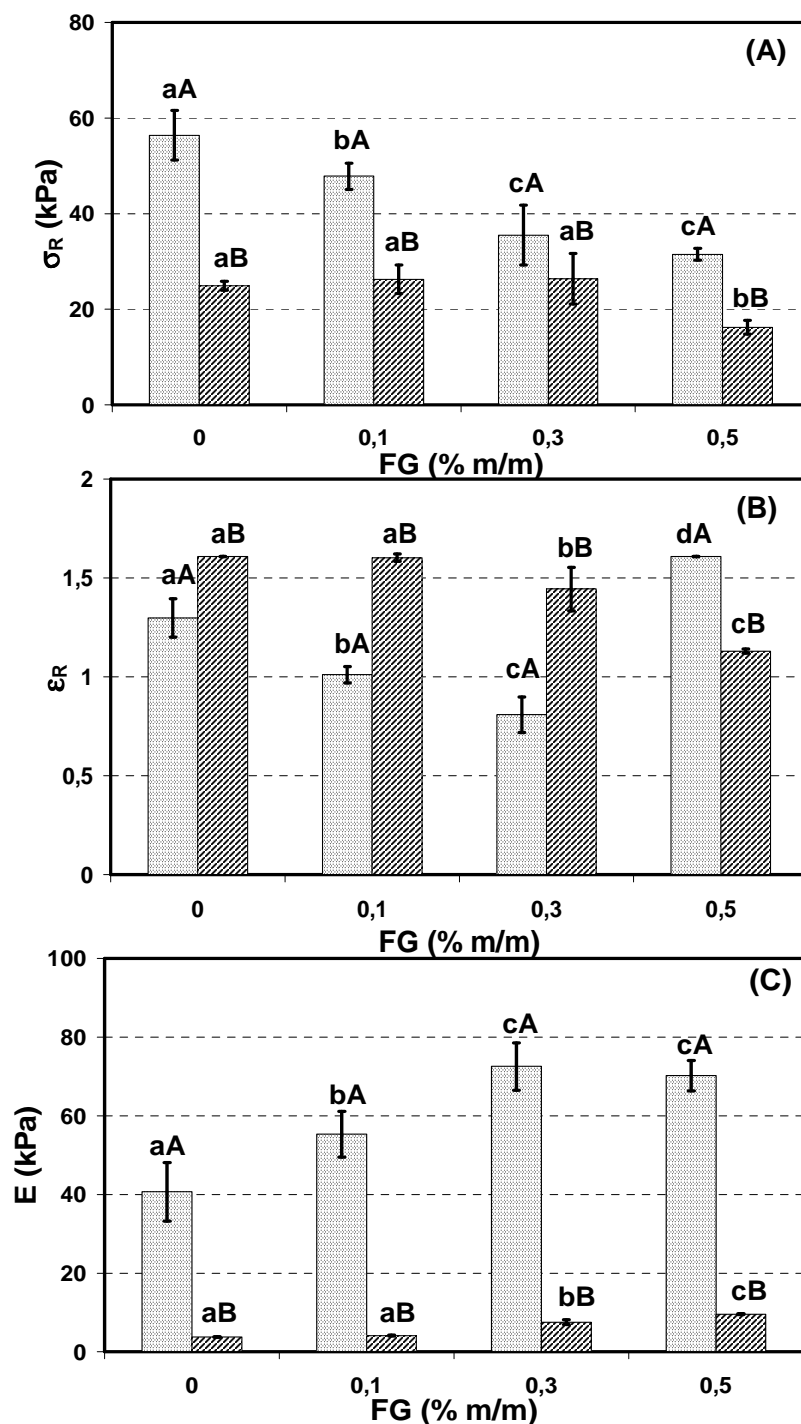


Figura 4.24. Propriedades mecânicas dos géis WPI – FG formados a frio através da difusão de sais de CaCl₂ (▤) ou NaCl (▨) utilizando membranas de diálise. (A) Tensão na ruptura (σ_R), (B) Deformação na ruptura (ϵ_R) e (C) Módulo de elasticidade (E). As barras representam o desvio padrão entre as replicatas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de polissacarídeo em cada sal estudado. Letras maiúsculas: diferenças entre os sais estudados na mesma concentração de polissacarídeo.

Através da avaliação da tensão de ruptura dos géis bipoliméricos pode-se entender qual o papel do polissacarídeo da linhaça na rigidez dos géis formados. Na Figura 4.24A, verifica-se que a adição de polissacarídeo causou diminuição nos valores de tensão na ruptura para ambos os sistemas, sendo os géis com adição de cloreto de cálcio mais rígidos que os géis com adição de cloreto de sódio, o que pode ser explicado pelo tipo de interação que os cátions divalentes promovem, como já citado no item 4.11.2.1. Esta diminuição na rigidez dos géis pode ter sido causada pela incompatibilidade termodinâmica dos biopolímeros com o aumento da concentração de FG. Segundo Bourriot et al. (1999), para o sistema caseína micelar – goma guar (neutra), a incompatibilidade pode estar relacionada com a exclusão mútua de volume dos biopolímeros, a qual é conhecida como efeito de exclusão de volume. No caso de biopolímeros de mesma carga, este efeito pode estar associado ao aparecimento de interações repulsivas entre os biopolímeros com o aumento da concentração (Tolstoguzov, 2003). Portanto, esta redução pode ser tanto consequência das interações repulsivas entre cargas semelhantes quanto da exclusão mútua de volume, devido ao caráter neutro e ácido da FG.

Nos sistemas WPI – FG, a concentração de polissacarídeo apresentou influência significativa ($p < 0,05$) sobre a deformabilidade dos géis com adição de CaCl_2 . Observou-se uma diminuição da deformabilidade com o aumento da concentração de FG até 0,3% (m/m), enquanto que os sistemas com NaCl foram mais deformáveis nestas mesmas concentrações. A influência negativa da adição de polissacarídeo em todas as concentrações no sistema com cloreto de sódio e da adição de até 0,3% (m/m) nos géis com cloreto de cálcio pode ser considerada como o resultado da incompatibilidade termodinâmica das macromoléculas (Figura 4.24B) que culminou com a separação de fases (Figura 4.23). A incompatibilidade pode estar associada à formação de agregados de grande massa molecular durante o aquecimento das proteínas do soro que podem

alcançar mais de 200 kDa (Cavallieri et al., 2007), sendo que o polissacarídeo da linhaça também possui alta massa molecular (Goh et al., 2006; Warrand et al., 2003).

O módulo de elasticidade para os sistemas com NaCl apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) a partir da adição de 0,3% (m/m) de polissacarídeo enquanto que, nos sistemas com CaCl_2 ele apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) com adição abaixo de 0,3% (m/m) de FG (Figura 4.24C). Estes valores se mostraram muito mais dependentes do tipo de sal adicionado do que os valores de tensão na ruptura e confirmaram o caráter mais rígido das estruturas formadas pelo cátion divalente. O aumento no módulo de elasticidade para os dois sistemas pode ser resultado da maior sensibilidade deste parâmetro, obtido a baixas deformações, às interações biopoliméricas.

A gelificação por meio de membranas de diálise pode ser considerada como um processo lento de difusão de sais, onde há predomínio da separação de fases devido à cinética de gelificação mais lenta. Ao utilizar a menor taxa de acidificação com GDL (pH final de 5,2), Cavallieri (2007) encontrou uma diminuição na força do gel com o aumento da concentração de goma guar, semelhante ao encontrado neste trabalho, enquanto que o módulo de elasticidade não apresentou mudança significativa ($p > 0,05$).

Estudos relacionados à gelificação a frio de proteínas do soro com adição de polissacarídeo da linhaça não foram encontrados na literatura. Porém, Chen et al. (2006a) avaliaram o efeito da adição do polissacarídeo da linhaça (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5% m/m) sobre a força, sinerese e propriedades viscoelásticas do gel de carragena que continham 0,1% de KCl. Foi observada uma diminuição na força e na sinerese do gel.

Traçando um paralelo entre a formação de géis a frio através da adição direta de sais (item 4.11.1.2) e através da difusão dos mesmos utilizando membranas de diálise (item 4.11.2.2), pode-se verificar que foram obtidos comportamentos completamente diferentes para os dois métodos de preparo de géis estudados. De uma maneira geral, para o primeiro, observou-se um aumento na elasticidade dos géis biopoliméricos de

cloreto de cálcio ou sódio, enquanto que a rigidez dos mesmos não foi influenciada pelo aumento da concentração de FG (Figuras 4.22C e A, respectivamente). Quanto à deformabilidade, apenas os géis formados pela adição de sais de sódio mostraram diminuição com a adição de polissacarídeo (Figura 4.22B). Já para o segundo método, o aumento na concentração de polissacarídeo resultou na diminuição da força e da deformação na ruptura e aumento na elasticidade dos géis, para ambos os sistemas (NaCl e CaCl_2) (Figuras 4.24A, B e C, respectivamente). A tensão e deformação na ruptura e o módulo de elasticidade dos géis em ambos os métodos apresentaram tendência semelhante, porém os sais estavam invertidos. Enquanto no método de adição direta de sais, os géis de CaCl_2 apresentaram os menores valores de tensão na ruptura e módulo de elasticidade e os maiores valores de deformação na ruptura em relação aos géis de NaCl (Figuras 4.22A, B e C), o contrário foi observado para o método de difusão de sais (Figuras 4.24A, B e C, respectivamente). Na adição direta de sais, os géis formados com CaCl_2 apresentaram-se mais frágeis, devido à ruptura causada pela agitação do sistema, sendo assim, os sais de sódio foram mais efetivos, resultando em géis mais rígidos (Figura 4.22A). No entanto, na difusão de sais, onde prevaleceu a separação de fases, o cálcio, através de suas pontes entre grupos carboxílicos negativos, foi mais efetivo, resultando em géis mais rígidos (Figura 4.24A). Comparando os dois métodos, gelificação rápida e lenta, em uma mesma concentração de FG, tem-se a obtenção de géis mais rígidos no método da adição direta de sais de sódio e de géis mais elásticos na difusão lenta de sais de cálcio.

4.11.2.3) Capacidade de retenção de água (WHC)

A capacidade de retenção de água está intimamente relacionada à estrutura da rede dos géis. A Figura 4.25 apresenta os resultados de capacidade de retenção de água dos géis bipolímeros formados a frio pela difusão de sais de cálcio ou sódio utilizando

membranas de diálise, em função da concentração de polissacarídeo da linhaça (% m/m de FG) adicionada à solução de proteínas do soro (8% m/m de WPI).

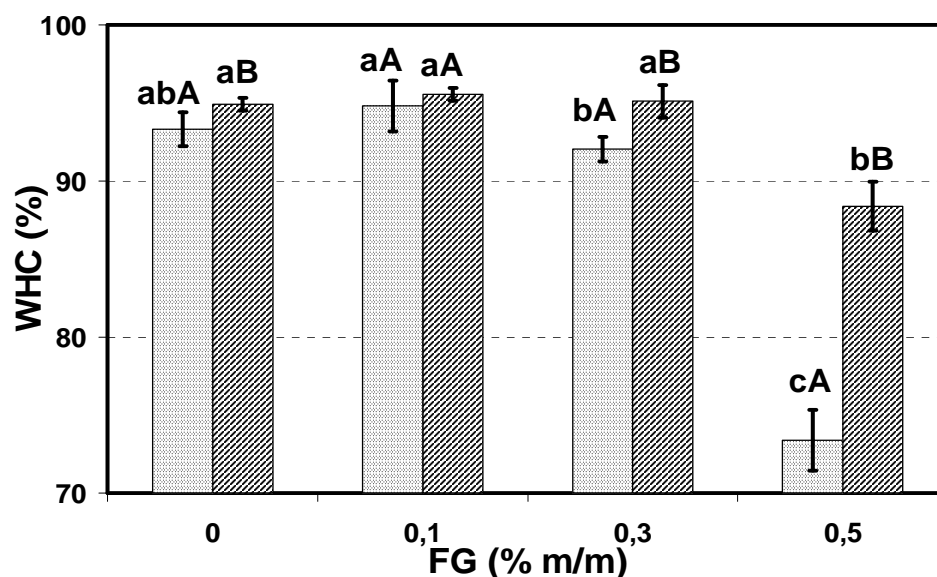


Figura 4.25. Capacidade de retenção de água (WHC) dos géis WPI – FG formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 (□) ou NaCl (▨) utilizando membranas de diálise. As barras representam o desvio padrão entre as replicatas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de polissacarídeo em cada sal estudado. Letras maiúsculas: diferenças entre os sais estudados na mesma concentração de polissacarídeo.

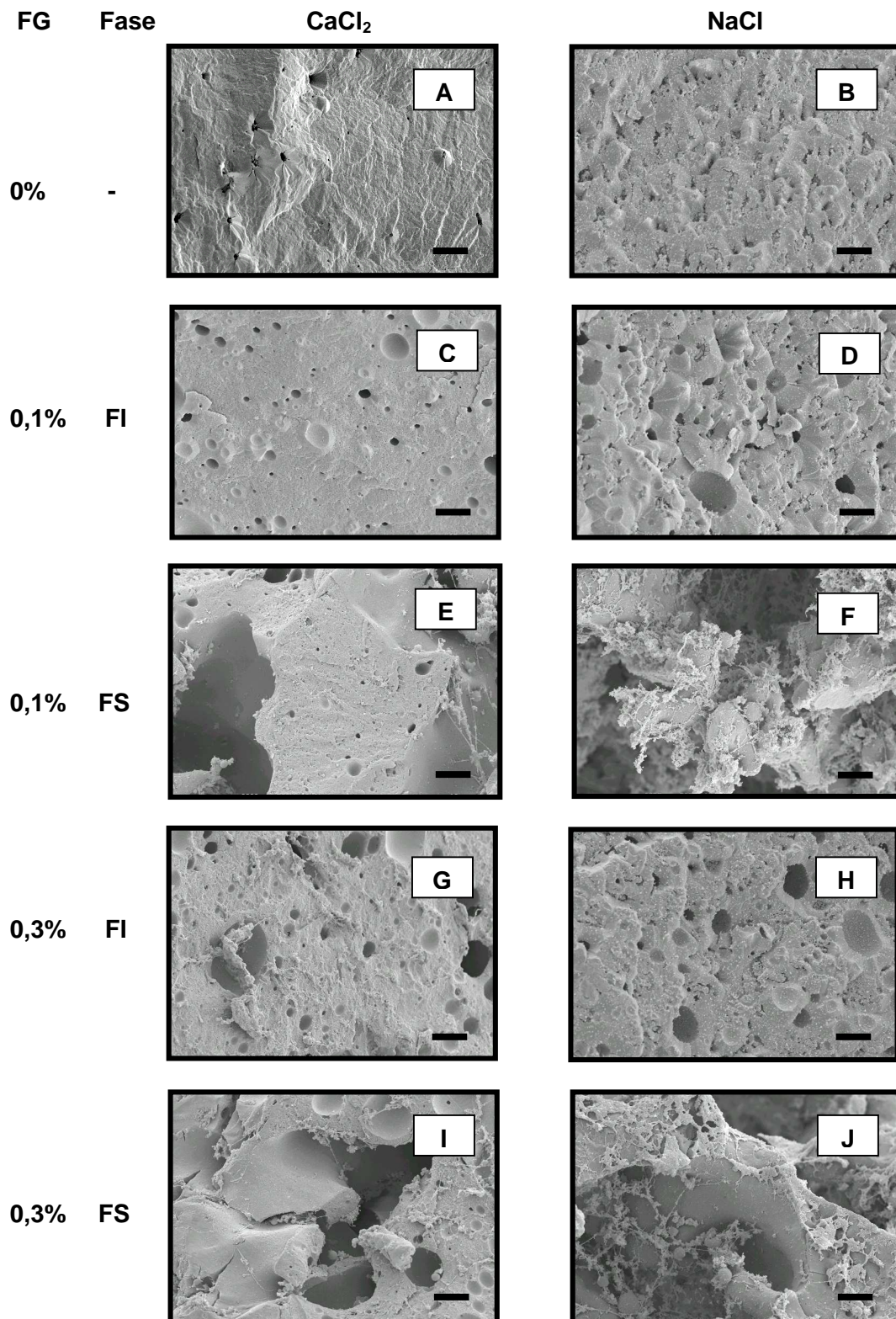
De maneira geral, as amostras bipoliméricas mostraram ótima WHC, visto que as proteínas do soro (Barbut, 1995a; Vardhanabhuti et al., 2001) e o polissacarídeo da linhaça apresentam boa capacidade de retenção de água, esta semelhante à goma guar (Chen et al., 2007; Chen et al., 2006a; Goh et al., 2006). Os resultados mostraram que a adição de uma alta concentração de polissacarídeo (0,5% m/m) levou a uma diminuição considerável ($p < 0,05$) na capacidade de retenção de água dos géis WPI – FG, independente do sal adicionado. Sendo assim, a redução na WHC foi consequência da incompatibilidade entre os biopolímeros em altas concentrações, que pode ter resultado em redes mais porosas com menor capacidade de reter a água via forças capilares. Os géis formados pela adição do sal de cátion monovalente apresentaram maior capacidade

de retenção de água, pois enquanto os cátions divalentes fecham muito as cadeias, indisponibilizando os sítios hidrofílicos para interação com a água devido ao tipo de ligação que eles promovem, o NaCl atraiu as moléculas de água que ficaram ao seu redor, impedindo que esta fosse liberada.

Outro estudo encontrado na literatura relacionado a sistemas mistos com adição de polissacarídeo da linhaça foi realizado por Chen et al. (2007). Os autores estudaram os efeitos da adição de goma de linhaça (0-2% m/m) sobre a temperatura de desnaturação térmica das proteínas da carne (principalmente miosina), textura e propriedades reológicas. A textura e as características visuais de géis de proteínas da carne modificaram significativamente devido a adição de goma de linhaça. À medida que a concentração de goma foi aumentada, os géis mistos apresentaram maior rigidez e diminuição da sinerese, diferente do encontrado neste trabalho, o que poderia ser atribuído à diferente natureza das proteínas envolvidas.

4.11.2.4) Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Para compreender melhor os resultados de propriedades mecânicas e WHC dos géis de proteínas do soro (WPI) e polissacarídeo da linhaça (FG) formados a frio pela difusão de sais através de membranas de diálise, analisou-se a estrutura destes géis utilizando a microscopia eletrônica de varredura (SEM). A Figura 4.26 apresenta as microestruturas dos géis em concentração fixa de WPI (8% m/m) e variada de FG (0; 0,1; 0,3 e 0,5% m/m) formados pela adição de sais de cálcio ou sódio nas fases superior e inferior (FS e FI, respectivamente) (Figuras 4.26A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M e N).



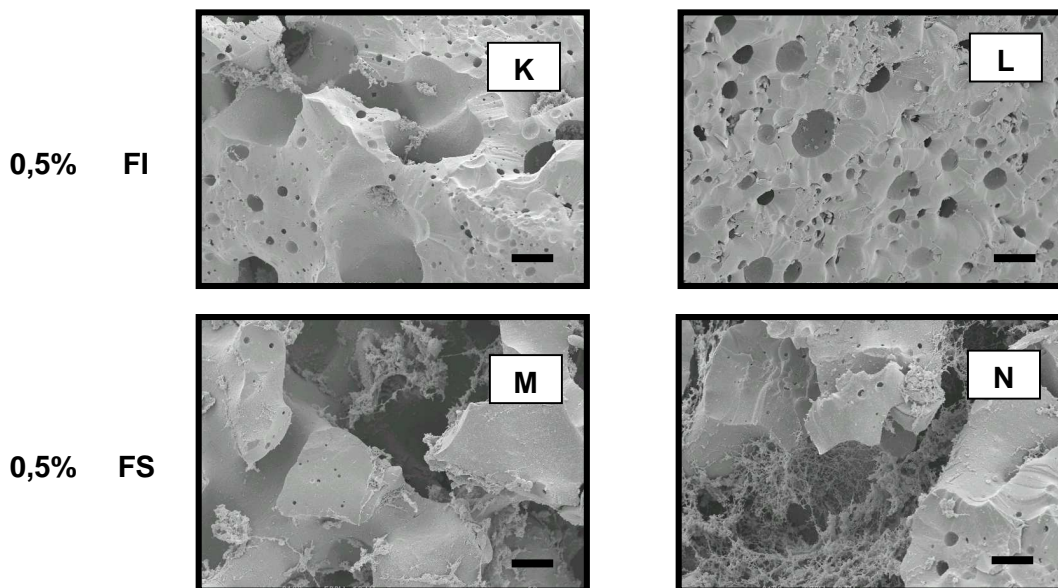


Figura 4.26. Micrografias SEM dos géis WPI – FG formados a frio pela difusão de sais de CaCl_2 (A, C, E, G, I, K, M) ou NaCl (B, D, F, H, J, L, N) utilizando membranas de diálise, nas fases superior e inferior (FS e FI, respectivamente). A barra de escala corresponde a 10 μm .

Analisando a Figura 4.26, observa-se que os géis formados pela adição de sais de sódio apresentaram-se mais descontínuos e porosos que os de cálcio na mesma fase e concentração de FG, o que explica a menor rigidez e elasticidade destes géis (Figuras 4.24A e C, respectivamente). Este comportamento foi semelhante ao encontrado para os géis puros de WPI (item 4.7). O aumento na porosidade da estrutura pode ser atribuído a uma obstrução da interação proteína-proteína pelo polissacarídeo e a um aumento nas repulsões eletrostáticas entre os mesmos.

Comparando as fases superior e inferior em uma mesma concentração de FG e mesmo sal, verificou-se que o gel da FI apresentou uma rede mais compacta, com espaços vazios esféricos aleatoriamente distribuídos, enquanto que a FS foi bem mais irregular. O aumento na concentração de polissacarídeo nos dois sistemas (NaCl ou CaCl_2) levou à formação de géis com estrutura mais aberta e heterogênea na FS e com maior quantidade de poros e descontinuidade na FI, o que justifica a menor capacidade

de retenção de água (Figura 4.25) e os menores valores de tensão na ruptura (Figura 4.24A) dos géis em maiores concentrações de polissacarídeo. A presença de grandes poros na rede do gel inibe a capacidade de imobilizar o solvente via forças capilares (Zeigler & Foegeding, 1990). Cavallieri (2007) também encontrou uma microestrutura mais aberta com o aumento da concentração de goma guar, utilizando a menor taxa de acidificação com GDL (pH final de 5,2).

A diferença observada nas microscopias das fases superior e inferior pode ser um indicativo da presença de polissacarídeo, principalmente na FS, onde se espera uma concentração deste biopolímero. Com isso, a fase rica em proteína levaria à formação de estruturas mais contínuas, enquanto que a presença do polissacarídeo acarretaria no aumento da porosidade (descontinuidade da rede). A separação de fases macroscópica poderia ser atribuída à cinética de separação de fases mais rápida que o processo de gelificação. De maneira geral, a competição entre a gelificação e a incompatibilidade dos biopolímeros (separação de fases) nos sistemas com adição de sais de cálcio ou sódio por difusão lenta (membranas de diálise) influenciou fortemente a microestrutura dos géis WPI – FG.

4.11.2.4.1) Avaliação da dimensão fractal (D_f) por análise de imagem SEM

Para quantificar a interferência do polissacarídeo no sistema de agregação das proteínas, foram realizadas análises de imagens em micrografias SEM para a determinação da dimensão fractal dos géis bipolímericos através do método de contagem de caixas. As médias de dimensão fractal (D_f) para os diferentes sistemas WPI – FG formados pela adição de sais de cálcio e sódio por difusão lenta (membranas de diálise), nas fases superior e inferior, estão apresentadas na Figura 4.27 (A, B, C e D, respectivamente).

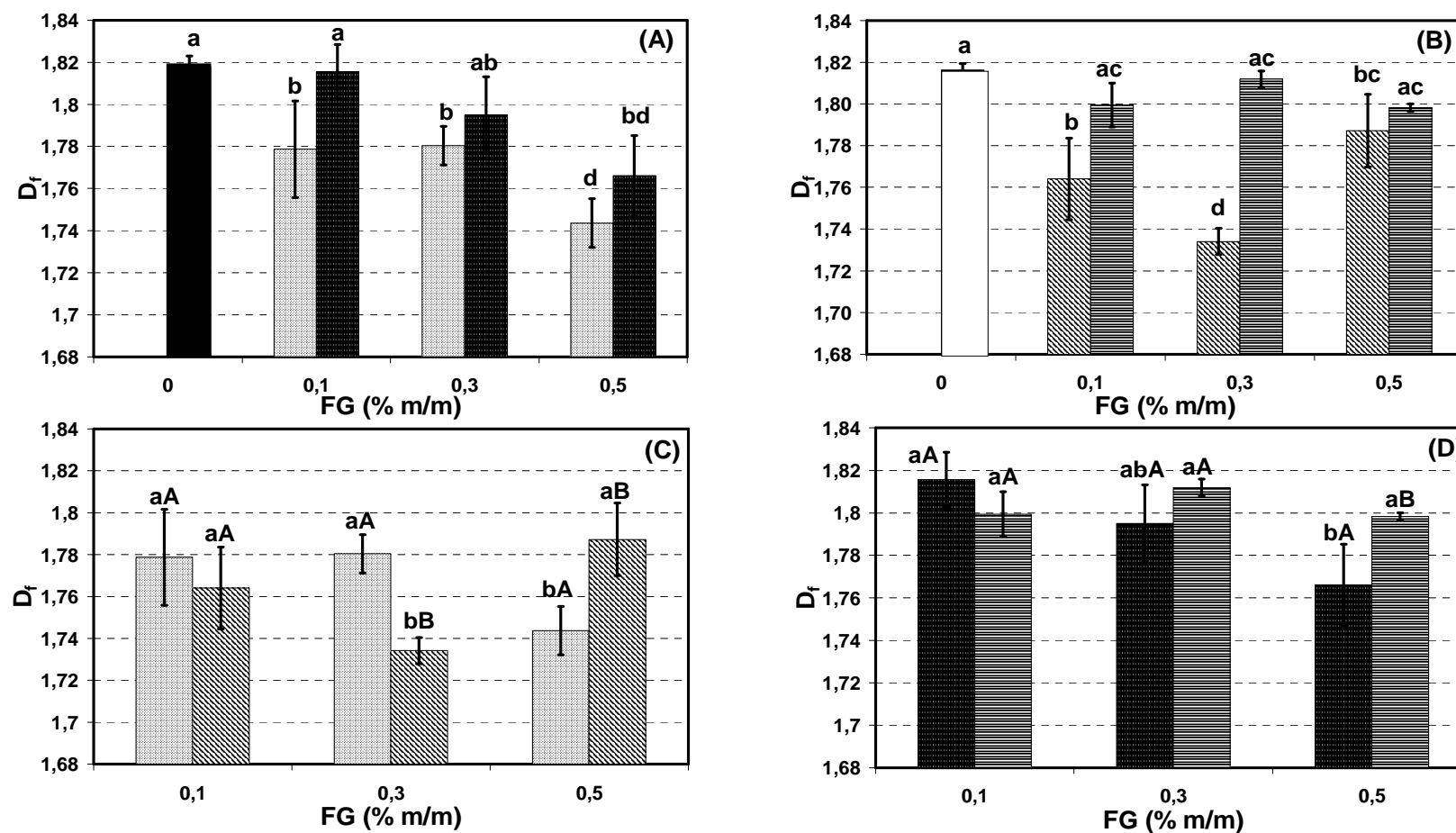


Figura 4.27. Dimensão fractal (D_f) dos géis WPI – FG formados a frio através da difusão de sais de CaCl_2 (▨ - FS) (■ - FI) (■ - puro WPI) (A) ou NaCl (▧ - FS) (▩ - FI) (□ - puro WPI) (B) utilizando membranas de diálise, nas fases superior (C) e inferior (D) (FS e FI, respectivamente). As barras representam o desvio padrão referentes a 5 imagens em 30 posições de grade. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de polissacarídeo em cada sal estudado. Letras maiúsculas: diferenças entre os sais estudados na mesma concentração de polissacarídeo.

Os valores médios de dimensão fractal (D_f) dos géis WPI – FG variaram entre 1,73 e 1,82, indicando um alto grau de complexidade fractal dos géis bipolímeros.

Observando-se a Figura 4.27A, verifica-se que para o sistema com adição de sais de cálcio, a dimensão fractal (D_f) na FI sofreu uma redução significativa ($p < 0,05$) apenas com a adição de 0,5% (m/m) de FG em relação ao gel puro de WPI. No entanto, na FS todas as concentrações de polissacarídeo reduziram os valores de D_f dos géis em relação ao gel puro. Na Figura 4.27B, para o sistema com adição de sais de sódio, comportamento semelhante foi observado para a FS, enquanto que os géis da FI, com a adição de polissacarídeo, apresentaram dimensões fractais estatisticamente iguais ($p > 0,05$) às dos géis puros de WPI.

Com relação à influência do sal adicionado sobre a dimensão fractal dos géis nas fases superior e inferior (Figuras 4.27C e D, respectivamente), pode-se dizer que na FS apenas na menor concentração de FG (0,1% m/m) os sais não apresentaram influência significativa ($p > 0,05$) sobre os valores de dimensão fractal. E na FI, apenas na maior concentração de polissacarídeo (0,5% m/m) os sais influenciaram significativamente ($p < 0,05$) sobre a D_f dos géis formados.

Assim, os resultados obtidos sugerem que a rede estrutural dos géis formados na fase superior foi influenciada pela adição de polissacarídeo e pelo tipo de sal adicionado, este último nas maiores concentrações de FG. Por outro lado, a fase inferior mostrou influência apenas da adição de 0,5% (m/m) de FG em relação ao gel puro de WPI, no sistema contendo cálcio, e do tipo de sal adicionado nesta mesma concentração de FG. Com isso, acredita-se que a influência da adição de polissacarídeo sobre a dimensão fractal dos géis da FS em relação ao gel puro de WPI indica que nesta fase prevaleceu a incompatibilidade entre os biopolímeros (separação de fases), resultando em maior porosidade do gel (Figura 4.26). O fato da D_f dos géis da fase inferior, de maneira geral,

não ter sido influenciada pela adição de FG pode ser um indício da ausência ou presença mínima de polissacarídeo nesta fase.

Analisando-se a Figura 4.27C, pode-se observar que os sistemas contendo CaCl_2 apresentaram uma redução na dimensão fractal em alta concentração de FG (0,5% m/m). Acredita-se que isto possa estar associado ao efeito de exclusão de volume entre a WPI e a FG, comportamento semelhante ao encontrado por Cavallieri (2007) em sistemas bipolímeros (WPI – guar). Para os géis com adição de NaCl, observou-se uma diminuição na D_f com o aumento da concentração de polissacarídeo de 0,1 – 0,3% (m/m), o que pode ser consequência da redução na rugosidade da rede do gel devido ao aumento nas interações eletrostáticas WPI – FG. A adição de 0,5% (m/m) de FG provocou um aumento na dimensão fractal, podendo ser atribuído à uma diminuição da mobilidade dos biopolímeros devido à alta viscosidade do sistema. Estes resultados para os géis com adição de NaCl foram semelhantes aos encontrados por Cavallieri (2007) em sistemas WPI – xantana.

CAPÍTULO 5. Conclusões Gerais

A partir dos resultados observados para os sistemas de proteínas do soro gelificadas a frio através da difusão de sais de cálcio ou sódio utilizando membranas de diálise, pode-se concluir que os diferentes sais levaram à formação de diferentes tipos de estruturas. A difusão de sais de cálcio resultou na formação de uma rede particulada (desordenada), e os géis apresentaram-se opacos, enquanto que a difusão de sais de sódio levou à formação de géis com estrutura mais ordenada e, conseqüentemente, mais translúcida. Em geral, o aumento na concentração de proteína levou a uma diminuição na claridade e porosidade dos géis e a um aumento na rigidez, elasticidade e capacidade de retenção de água, em ambos os sistemas (NaCl e CaCl_2). Os géis formados pela difusão de sais de cálcio apresentaram-se mais rígidos e elásticos, menos deformáveis e com menor capacidade de retenção de água em relação aos géis de sódio. A estrutura fractal dos géis foi avaliada através da análise de imagem e das propriedades mecânicas, sendo observados resultados similares. Além disso, pode-se concluir que os géis de proteínas do soro apresentam natureza de ligação fraca, o que indica que as ligações mais rígidas entre os agregados protéicos foram formadas na etapa de desnaturação da proteína, sendo elas responsáveis pelas características de resistência da rede formada.

Em relação ao estudo de caracterização do polissacarídeo da linhaça, observou-se um comportamento de fluido pseudoplástico sem tensão residual. A adição de sais levou a uma redução na viscosidade intrínseca e nos módulos elástico e viscoso das soluções. Em geral, esta redução foi resultado das interações entre os grupos carregados negativamente do polímero e os íons salinos, o que resultou em menor volume hidrodinâmico e elasticidade.

Nos géis mistos de polissacarídeo da linhaça e proteínas do soro observou-se um aumento da complexidade, modificação da estrutura e das propriedades dos géis, em relação aos géis puros de proteínas do soro. Através do estudo dos métodos de preparo dos géis, a adição direta ou a difusão de sais, pode-se observar a formação de sistemas

com propriedades mecânicas bastante distintas, sendo a separação de fases macroscópica observada apenas no segundo método. Em geral, na formação de géis bipoliméricos pela difusão lenta de sais através de membranas de diálise, o aumento na concentração de polissacarídeo da linhaça levou a uma diminuição na rigidez, deformabilidade e na capacidade de retenção de água dos géis como consequência da incompatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros. Esta incompatibilidade resultou em um aumento na porosidade dos géis observada nas microscopias, sendo que os géis da fase superior apresentaram-se mais irregulares e tiveram sua dimensão fractal influenciada pela concentração de polissacarídeo e pelo tipo de sal adicionado, enquanto que os géis da fase inferior apresentaram um indício da ausência ou presença mínima de polissacarídeo. No entanto, foi com a adição direta de sais de sódio que obteve-se os géis bipoliméricos mais fortes, enquanto que a maior fragilidade dos géis obtidos com a adição direta de sais de cálcio, poderia ser minimizada utilizando-se um menor tempo de agitação do sistema. Portanto, conclui-se que o método da adição direta de sais seria o mais indicado visando melhor estrutura (sem separação de fases macroscópica) e propriedades mecânicas dos géis formados com maior viabilidade de uso em escala industrial.

CAPÍTULO 6. Referências Bibliográficas

- ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, C. G.; PAQUES, M.; VISSCHERS, R. W. Number of thiol groups rather than the size of the aggregates determines the hardness of cold set whey protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 469 – 479, 2003a.
- ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, C. G.; VISSCHERS, R. W. Cold-set globular protein gels: Interactions, structure and rheology as a function of protein concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3150 – 3156, 2003b.
- ALTING, A. C. **Cold gelation of globular proteins**. 2003. 129 p. (PhD Thesis) – Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2003c.
- ALTING, A. C.; HAMER, R. J.; DE KRUIF, C. G.; VISSCHERS, R. W. Formation of disulfide bonds in acid-induced gels of preheated whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5001 – 5007, 2000.
- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists, Patricia Cunniff, Gaithersburg, USA, 1997.
- BARBUT, S. Effect of sodium level on the microstructure and texture of whey protein isolate gels. **Food Research International**, v. 28, p. 437 – 443, 1995a.
- BARBUT, S. Effects of calcium level on the structure of pre-heated whey protein isolate gels. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 598 – 603, 1995b.
- BARBUT, S.; FOEGEDING, E. A. Ca^{2+} -induced gelation of pre-heated whey protein isolate. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 867-871, 1993.
- BEER, M. U; WOOD, P. J.; WEISZ, J. A simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constants of linear random coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 377 – 380, 1999.
- BERTRAND, M-E.; TURGEON, S. L. Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 159 – 166, 2007.
- BLATZ, P. J.; SHARDA, S. C.; TSCHOEGL, N. W. Strain energy function for rubber-like materials based on a generalized measure of strain. **Transactions of the Society of Rheology**, v. 18, p. 145 – 161, 1974.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 37, p. 911 – 917, 1959.

- BOTTOMLEY, R. C.; EVANS, M. T. A.; PARKINSON, D. J. Whey proteins. In: HARRIS, P. (Ed.). **Food Gels**. London/New York: Elsevier Applied Science, 1990. Cap. 11, p. 435 – 466.
- BOURRIOT, S.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J.-L. Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein – guar gum mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 43 – 49, 1999.
- BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 383 – 390, 2000a.
- BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of NaCl and CaCl₂ on cold-set gelation of heat-denatured whey protein. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 801 – 804, 2000b.
- BRYANT, C. M.; MCCLEMENTS, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 143 – 151, 1998.
- CAVALLIERI, A. L. F. **Gelificação a frio de proteínas do soro do leite: Efeito da taxa de acidificação, pH final e adição de polissacarídeos**. 2007. 218 p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- CAVALLIERI, A. L. F.; COSTA-NETTO, A. P.; MENOSSI, M.; CUNHA, R. L. Whey protein interactions in acid cold-set gels at different pH values. **Lait**, v. 87, p. 535 – 554, 2007.
- CHANDRASEKARAN, R.; PUIGJANER, L. C.; JOYCE, K. L.; ARNOTT, S. Cation interactions in gellan: An x-ray study of the potassium salt. **Carbohydrate Research**, v. 181, p. 23 – 40, 1988.
- CHATTERTON, D. E. W. SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin – Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1229 – 1240, 2006.
- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. Aminoácidos, peptídeos y proteínas. In: Fennema O. R. (Ed.). **Química de los Alimentos**. Editorial Acirbia, Zaragoza, 1996, p. 275 – 414.
- CHEN, H.-H.; XU, S.-Y.; WANG, Z. Interaction between flaxseed gum and meat protein. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1051 – 1059, 2007.
- CHEN, H.-H.; XU, S.-Y.; WANG, Z. Gelation properties of flaxseed gum. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 295 – 303, 2006a.

- CHEN, L. Y.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 272 – 283, 2006b.
- CUI, W.; MAZZA, G. Physicochemical characteristics of flaxseed gum. **Food Research International**, v. 29, p. 397 – 402, 1996.
- CUI, W.; MAZZA, G.; BILIADERIS, C. G. Chemical structure, molecular size distributions, and rheological properties of flaxseed gum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1891 – 1895, 1994a.
- CUI, W.; MAZZA, G.; OOMAH, B. D.; BILIADERIS, C. G. Optimization of an aqueous extraction process for flaxseed gum by response surface methodology. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 27, p. 363 – 369, 1994b.
- DAMODARAN, S. Structure – function relationships of whey proteins. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (Eds.). **Food proteins and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. Cap. 8, p. 225 – 256.
- DÀVILA, E.; PARÉS, D. Structure of heat-induced plasma protein gels studied by fractal and lacunarity analysis. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 147 – 153, 2007.
- DE JONG, S.; VAN DE VELDE, F. Charge density of polysaccharide controls microstructure and large deformation properties of mixed gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1172 – 1187, 2007.
- DÍAZ-ROJAS, E. I.; PACHECO-AGUILAR, R.; LIZARDI, J.; ARGÜELLES-MONAL, W.; VALDEZ, M. A.; RINAUDO, M.; GOYCOOLEA, F.M. Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 293 – 304, 2004.
- DICKINSON, E. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 347 – 354, 1998.
- DOI, E. Gels and gelling of globular proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, p. 1 – 5, 1993.
- FEDENIUK, R. W.; BILIADERIS, C. G. Composition and physicochemical properties of linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 240 – 247, 1994.

- FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P.; DOUCET, D.; MCGUFFEY, M. K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality, **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 151 – 159, 2002.
- FREITAS, I. C. **Estudo das interações entre biopolímeros e polpas de frutas tropicais em cisalhamento estacionário e oscilatório**. 2002. 259 p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- GOH, K. K. T.; PINDER, D. N.; HALL, C. E.; HEMAR, Y. Rheological and light scattering properties of flaxseed polysaccharide aqueous solutions. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3098 – 3103, 2006.
- GRINBERG, V. Y.; TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 11, p. 145 – 158, 1997.
- HAGIWARA, T.; KUMAGAI, H.; NAKAMURA, K. Fractal analysis of aggregates in heat-induced BSA gels. **Food Hydrocolloids**, v. 12, p. 29 – 36, 1998.
- HAGIWARA, T.; KUMAGAI, H.; MATSUNAGA, T. Fractal analysis of the elasticity of BSA and β -Lactoglobulin gels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3807 – 3812, 1997a.
- HAGIWARA, T.; KUMAGAI, H.; MATSUNAGA, T.; NAKAMURA, K. Analysis of aggregate structure in food protein gels with the concept of fractal. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 1663 – 1667, 1997b.
- HAVEA, P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Characterization of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 483 – 497, 2001.
- HODGE, J. R.; HOFREITER, B. T. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press, 1962, p. 380 – 394.
- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Structure-forming processes in Ca^{2+} -induced whey protein isolate cold gelation. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 827 – 834, 1998.
- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Effect of gelation temperature on Ca^{+2} -induced gelation of whey protein isolate. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 30, p. 45 – 49, 1997a.
- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Protein and salt effects on Ca^{+2} -induced cold gelation of whey protein isolate. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 382 – 385, 1997b.

- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S. Ca^{2+} -induced gelation of whey protein isolate: effects of pre-heating. **Food Research International**, v. 29, p. 135 – 139, 1996.
- HONGSPRABHAS, P.; BARBUT, S.; MARANGONI, A. G. The structure of cold-set whey protein isolate gels prepared with Ca^{++} . **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 32, p. 196 – 202, 1999.
- IZYDORCZYK, M.; CUI, S. W.; WANG, Q. Polysaccharide gums: Structures, functional properties, and applications. In: CUI, S. W. (Ed.). **Food carbohydrates: Chemistry, physical properties and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005. Chap. 6, p. 263 – 308.
- JU, Z. Y.; KILARA, A. Effects of preheating on properties of aggregates and of cold-set gels of whey protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3604 – 3608, 1998a.
- JU, Z. Y.; KILARA, A. Textural properties of cold-set gels induced from heat-denatured whey protein isolates. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 288 – 292, 1998b.
- JU, Z. Y.; KILARA, A. Gelation of pH-aggregated whey protein isolate solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1830 – 1835, 1998c.
- KARPERIEN, A. **FracLac advanced user's manual**. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fraclac.html>>. Acesso em: 25 set. 2008.
- KAYE, B. H. **A random walk through fractal dimensions**. First Edition ed. Weinheim, Germany: VHC Verlagsgesellschaft, 1989. 421 p.
- KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: Chemical, physical, and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 33, p. 343 – 437, 1989.
- LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheological of industrial polysaccharides: Theory and applications**. First Edition ed. Glasgow, Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall, 1995. 620 p.
- LAU, M. H.; TANG, J.; PAULSON, A. T. Texture profile and turbidity of gellan/gelatin mixed gels. **Food Research International**, v. 33, p. 665 – 671, 2000.
- LI, J.; OULD ELEYA, M. M.; GUNASEKARAN, S. Gelation of whey protein and xanthan mixture: Effect of heating rate on rheological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 678 – 686, 2006.
- LIZARRAGA, M. S.; DE PIANTE VICIN, D.; GONZÁLEZ, R.; RUBIOLO, A.; SANTIAGO, L. G. Rheological behaviour of whey protein concentrate and λ -carrageenan aqueous mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 740 – 748, 2006.

- LOPES, G. K.; ALVIANO, D. S.; TORRES, D.; GONÇALVES, M. P.; ANDRADE, C. T. Gelation of whey protein concentrate in the presence of partially hydrolyzed waxy maize starch and urea at pH 7.5. **Colloid and Polymer Science**, v. 285, p. 203 – 210, 2006.
- MALTAIS, A.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Mechanisms involved in the formation and structure of soya protein cold-set gels: A molecular and supramolecular investigation. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 550 – 559, 2008.
- MANDELBROT, B. **The fractal geometry of nature**. New York: Freeman Press, 1983. 468 p.
- MARANGONI, A. G.; BARBUT, S.; MCGAULEY, S. E.; MARCONE, M.; NARINE, S. S. On the structure of particulate gels – the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 61 – 74, 2000.
- MAZZA, G.; BILIADERIS, C. G. Functional properties of flaxseed mucilage. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 1302 – 1305, 1989.
- MCCLEMENTS, D. J. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 621 – 625, 2006.
- MCCLEMENTS, D. J.; KEOGH, M. K. Physical properties of cold-setting gels formed from heat-denatured whey protein isolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, p. 7 – 14, 1995.
- MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, p. 431 – 476, 1993.
- OLSSON, C.; STADING, M.; HERMANSSON, A. M. Rheological influence of non-gelling amylopectins on β -lactoglobulin gel structures. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p. 473 – 483, 2000.
- OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 193 – 198, 1999.
- OOMAH, B. D.; KENASCHUK, E. O.; CUI, W.; MAZZA, G. Variation in the composition of water-soluble polysaccharides in flaxseed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 1484 – 1488, 1995.
- PÉREZ, O. E.; WARGON, V.; PILOSOFF, A. M. R. Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 966 – 974, 2006.

- PERRECHIL, F. A. **Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas estabilizadas por caseinato de sódio**. 2008. 95 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- PUGNALONI, L. A.; MATIA-MERINO, L.; DICKINSON, E. Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: quantification from confocal microscopy and image analysis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 42, p. 211 – 217, 2005.
- RAO, M. A. Classification, description and measurement of viscoelastic properties of solid foods. In: RAO, M. A.; STEFFE, J. F. (Eds.). **Viscoelastic properties of foods**. London: Elsevier, 1992, p. 3 – 47.
- RASBAND, W. S. **ImageJ**, U.S. National Institutes of Health. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 25 set. 2008.
- REMONDETTO G. E.; SUBIRADE, M. Molecular mechanism of Fe²⁺-induced β -lactoglobulin cold gelation. **Biopolymers**, v. 69, 461 – 469, 2003.
- ROFF, C. F.; FOEGEDING, E. A. Dicationic-induced gelation of pre-denatured whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 10, p. 193 – 198, 1996.
- SANCHEZ, C.; ZUNIGA-LOPEZ, R.; SCHMITT, C.; DESPOND, S.; HARDY, J. Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 199 – 212, 2000.
- SGARBIERI, V. C. Structural and physicochemical properties of milk proteins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p. 43 – 56, 2005.
- SHIH, W. H.; SHIH, W. Y.; KIM, S. I.; LIU, J.; AKSAY, I. A. Scaling behavior of the elastic properties of colloidal gels. **Physical Review A**, v. 42, p. 4772 – 4779, 1990.
- SLAVIN, J. L. Dietary fiber and body weight. **Nutrition**, v. 21, p. 411 – 418, 2005.
- STEFFE, J.F. Introduction to Rheology. **Rheological methods in food process engineering**. East Lansing: Freeman Press, 1996. Chap. 1, p. 1 – 93.
- STEWART, S; MAZZA, G. Effect of flaxseed gum on quality and stability of a model salad dressing. **Journal of Food Quality**, v. 23, p. 373 – 390, 2000.
- SYRBE, A.; BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, H. Polymer science concepts in dairy systems - An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 179 – 193, 1998.
- TAVARES, C.; MONTEIRO, S. R.; MORENO, N.; SILVA, J. A. L. Does the branching degree of galactomannans influence their effect on whey protein gelation? **Colloids**

- and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 270 – 271, p. 213 – 219, 2005.
- TOLSTOGUZOV, V. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 1 – 23, 2003.
- TOTOSAUS, A.; MONTEJANO, J. G.; SALAZAR, J. A.; GUERRERO, I. A review of physical and chemical protein-gel induction. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 589-601, 2002.
- VALIM, M. D.; CAVALLIERI, A. L. F.; CUNHA, R. L. Whey protein/arabic gum gels formed by chemical or physical gelation process. **Food Biophysics**, “in press”. DOI 10.1007/s11483-008-9098-z.
- VARDHANABHUTI, B.; FOEGEDING, E. A.; MCGUFFEY, M. K.; DAUBERT, C. R.; SWAISGOOD, H. E. Gelation properties of dispersions containing polymerized and native whey protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 165 – 175, 2001.
- WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; SHAHIDI, F. Removal of flaxseed mucilage by chemical and enzymatic treatments. **Food Chemistry**, v. 59, p. 47 – 55, 1996.
- WANG, Y.; WANG, L.-J.; LI, D.; ÖZKAN, N.; CHEN, X. D.; MAO, Z.-H. Effect of flaxseed gum addition on rheological properties of native maize starch. **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 87 – 92, 2008.
- WARRAND, J.; MICHAUD, P.; PICTON, L.; MULLER, G.; COURTOIS, B.; RALAINIRINA, R.; COURTOIS, J. Structural investigations of the neutral polysaccharide of *Linum usitatissimum* L. seeds mucilage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, p. 121 – 125, 2005.
- WARRAND, J.; MICHAUD, P.; PICTON, L.; MULLER, G.; COURTOIS, B.; RALAINIRINA, R.; COURTOIS, J. Large-scale purification of water-soluble polysaccharides from flaxseed mucilage, and isolation of a new anionic polymer. **Chromatographia**, v. 58, p. 331 – 335, 2003.
- WU, H.; MORBIDELLI, M. A model relating structure of colloidal gels to their elastic properties. **Langmuir**, v. 17, p. 1030 – 1036, 2001.
- YE, A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 406 – 415, 2008.
- ZEIGLER, G. R.; FOEGEDING, E. A. The gelation of proteins. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 34, p. 203 – 298, 1990.

**ANEXO 1. Estudo da condição ótima de extração do polissacarídeo da
linhaça. Validação da razão de precipitação etanol:extrato, temperatura
de extração e razão de diluição água:semente**

Nesta sessão estão apresentados os ensaios preliminares realizados na tentativa de reproduzir a condição otimizada por Cui et al. (1994b) para a extração aquosa do polissacarídeo da linhaça (FG). Neste estudo, os autores avaliaram a extração em função da temperatura (25-100°C), pH (2,0-7,0) e razão água:semente (6,0-20,0), tendo como respostas o rendimento, a viscosidade aparente e o teor de proteína da FG. Utilizando a metodologia de superfície de resposta, as condições ótimas de extração encontradas foram: temperatura de 85-90°C, pH 6,5-7,0 e razão água:semente de 13,0. No entanto, além da condição otimizada por Cui et al. (1994b), optou-se por estudar outras condições, com o intuito de melhorar o rendimento de FG, facilitar o processo de extração e reduzir resíduos e custos. Então, as condições de extração avaliadas foram: razão de precipitação etanol:extrato (1:1, 2:1 e 3:1), temperatura de extração (85°C, 40°C e choque inicial a 85°C com extração à temperatura ambiente) e razão água:semente (13; 17,2 e 20,0). A variável razão de precipitação etanol:extrato não foi estudada por Cui et al. (1994b), sendo a precipitação em três volumes de etanol 95% utilizada pelos autores. Os ensaios foram realizados com a semente de linho comprada em um supermercado local.

A Figura A1 apresenta um esquema da extração do polissacarídeo da linhaça e das diferentes condições avaliadas nos três estudos realizados.

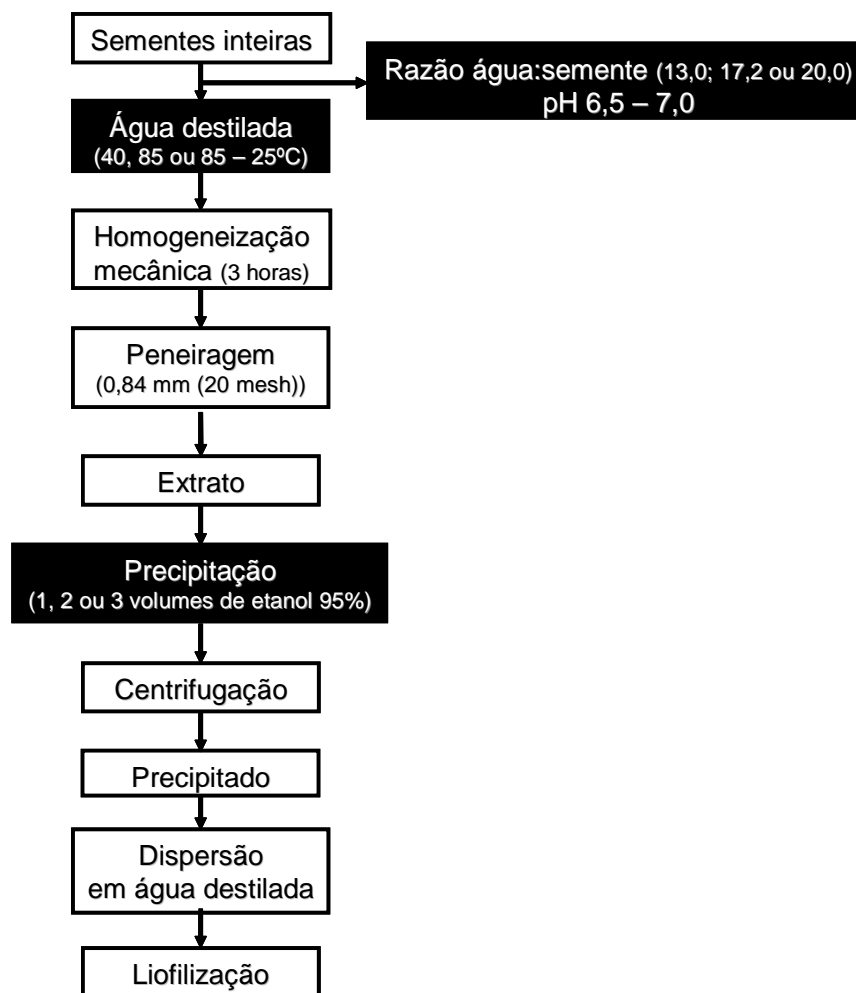


Figura A1. Fluxograma de estudo da extração do polissacarídeo da linhaça.

A centrifugação foi realizada a 10000 g, 4°C e 30 min, de acordo com Fedeniuk & Biliaderis (1994) e o tempo de liofilização foi definido em 72 horas de acordo com ensaios preliminares.

1.1) Razão de precipitação etanol:extrato

Este estudo foi realizado com o intuito de minimizar custos em relação ao volume de etanol utilizado nas precipitações e conseqüentemente, reduzir o volume de resíduo gerado, sem que houvesse grandes perdas no rendimento. Para isso, avaliou-se três diferentes razões etanol:extrato (1:1, 2:1 e 3:1) na precipitação de FG e os resultados

estão apresentados na Tabela A1. A razão água:semente utilizada foi de 13,0 (otimizada por Cui et al., 1994b) e a temperatura de extração foi o choque inicial a 85°C com extração à temperatura ambiente (25°C). Apesar desta condição não ser a otimizada, optou-se por ela devido à sua facilidade na etapa de peneiragem (baixa viscosidade). Esta extração consistiu em mergulhar as sementes de linho inteiras em água destilada, inicialmente a 85°C, e então, realizar a homogeneização mecânica sem controle de temperatura, sendo que ao final das 3 horas de agitação a solução estava a 25°C.

Tabela A1. Resultados da FG extraída em relação à FG inicial utilizando diferentes razões de precipitação etanol:extrato.

Razão etanol:extrato	Massa de semente (g)	Volume de extrato (mL)	FG extraída e liofilizada (g)	$\frac{FG_{extraída}}{FG_{inicial}}$
1:1	22	200	$0,79 \pm 0,04$	0,45
2:1	22	200	$1,09 \pm 0,06$	0,62
3:1	22	200	$1,12 \pm 0,08$	0,64

Estes valores são a média de dois ensaios.

A partir da Tabela A1, verifica-se que utilizando a razão etanol:extrato de 2:1 obtém-se uma melhora no rendimento de FG em torno de 38% em relação à razão 1:1. No entanto, utilizando um volume de etanol 3 vezes maior que o volume de extrato, obteve-se um aumento no rendimento em torno de 3% em relação à razão 2:1. Assim, apesar deste pequeno aumento ao utilizar uma razão 3:1, acredita-se que o melhor seria precipitar em dois volumes de etanol 95%, pois reduziria bastante o consumo de etanol e conseqüentemente, os custos e a geração de resíduos.

1.2) Temperatura de extração

O objetivo deste estudo foi verificar a influência da temperatura de extração sobre o rendimento de fibras solúveis em relação ao valor teórico e o rendimento de FG em

relação à massa seca e úmida das sementes. Além disso, foi avaliada a influência da temperatura de extração sobre as propriedades reológicas dos extratos obtidos. Foram estudadas três diferentes temperaturas de extração: 85°C, 40°C e choque inicial a 85°C com extração à temperatura ambiente (25°C), baseado no estudo de Cui et al. (1994b), e os resultados estão apresentados na Tabela A2. As duas primeiras condições foram estudadas em béquer encamisado com circulação externa de água quente e a última, foi estudada conforme já descrito no item 1.1. Para o cálculo do rendimento de fibras solúveis em relação ao valor teórico foi considerado que 8% de fibras solúveis estão presentes nas sementes de linho, de acordo com Goh et al. (2006). A razão etanol:extrato utilizada foi de 2:1 (definida no item 1.1) e a razão água:semente foi de 13,0 (otimizada por Cui et al., 1994b).

Tabela A2. Rendimento de extração em diferentes temperaturas.

Temperatura de extração (°C)	Rendimento (%)		
	Fibras solúveis em relação ao valor teórico	FG em relação à massa seca semente	FG em relação à massa úmida semente
85	82,80	6,91	6,62
85	86,90	7,25	6,95
85	69,40	5,81	5,55
40	57,60	4,81	4,61
85 – 25	44,64	3,74	3,57
85 – 25	43,43	3,64	3,47
85 – 25	46,67	3,91	3,73

Mazza & Biliaderis (1989) realizaram um estudo da influência do tempo (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 horas) e da temperatura (25°C, 100 – 25°C e 100°C) de extração aquosa da mucilagem da semente de linho, e encontraram a 25°C uma variação no rendimento de 3,5 a 5,5% de mucilagem em relação à massa de semente no intervalo

estudado (0,5-8,0 horas), enquanto que extrações a quente (100°C) renderam em torno de 9% de FG no mesmo intervalo de tempo. Com o intuito de diminuir o escurecimento que foi observado na extração a 100°C em relação à extração à temperatura ambiente e melhorar o rendimento, os autores realizaram uma extração à temperatura ambiente, mas com a água inicialmente a 100°C, obtendo um rendimento em torno de 7,7% de mucilagem com 3 horas de extração. A partir destes dados e analisando-se a Tabela A2, verifica-se que a extração a 85°C foi a que apresentou os maiores rendimentos de FG, condição em que também foi observado um maior escurecimento do extrato em relação à extração 85 – 25°C, porém o rendimento da extração de FG nesta última condição reduziu quase que pela metade, diferente do encontrado pelos autores. Com isso, conclui-se que não valeria a pena reduzir a temperatura de extração com o intuito de diminuir o escurecimento do extrato, pois perde-se muito em rendimento de FG. Os resultados encontrados foram inferiores aos obtidos por Mazza & Biliaderis (1989), porém deve-se salientar que neste estudo utilizou-se maior razão água:semente (1:20 m/v) e maior temperatura de extração.

De acordo com o modelo obtido por Cui et al. (1994b) para a extração aquosa de FG, obtém-se um rendimento em torno de 3,6% de FG em relação à massa de semente na temperatura de 40°C, pH 6,5-7,0 e razão água:semente de 13,0, resultado este inferior ao encontrado no presente trabalho. Ainda pelo modelo, na condição otimizada (temperatura de 85°C, pH 6,5-7,0 e razão água:semente de 13,0), o rendimento seria em torno de 7,2%. Cui et al. (1994a) extraíram a goma utilizando a metodologia otimizada por Cui et al. (1994b) e encontraram um rendimento de 7,9% de FG em relação à massa de semente. Os rendimentos obtidos nestes dois estudos foram apenas um pouco superiores ao encontrados neste trabalho.

A Figura A2 apresenta o comportamento reológico do extrato das sementes de linho no estado estacionário em função da taxa de deformação. Os extratos avaliados

foram obtidos a partir da extração a 85°C e utilizando o choque inicial a 85°C e extração à temperatura ambiente (25°C).

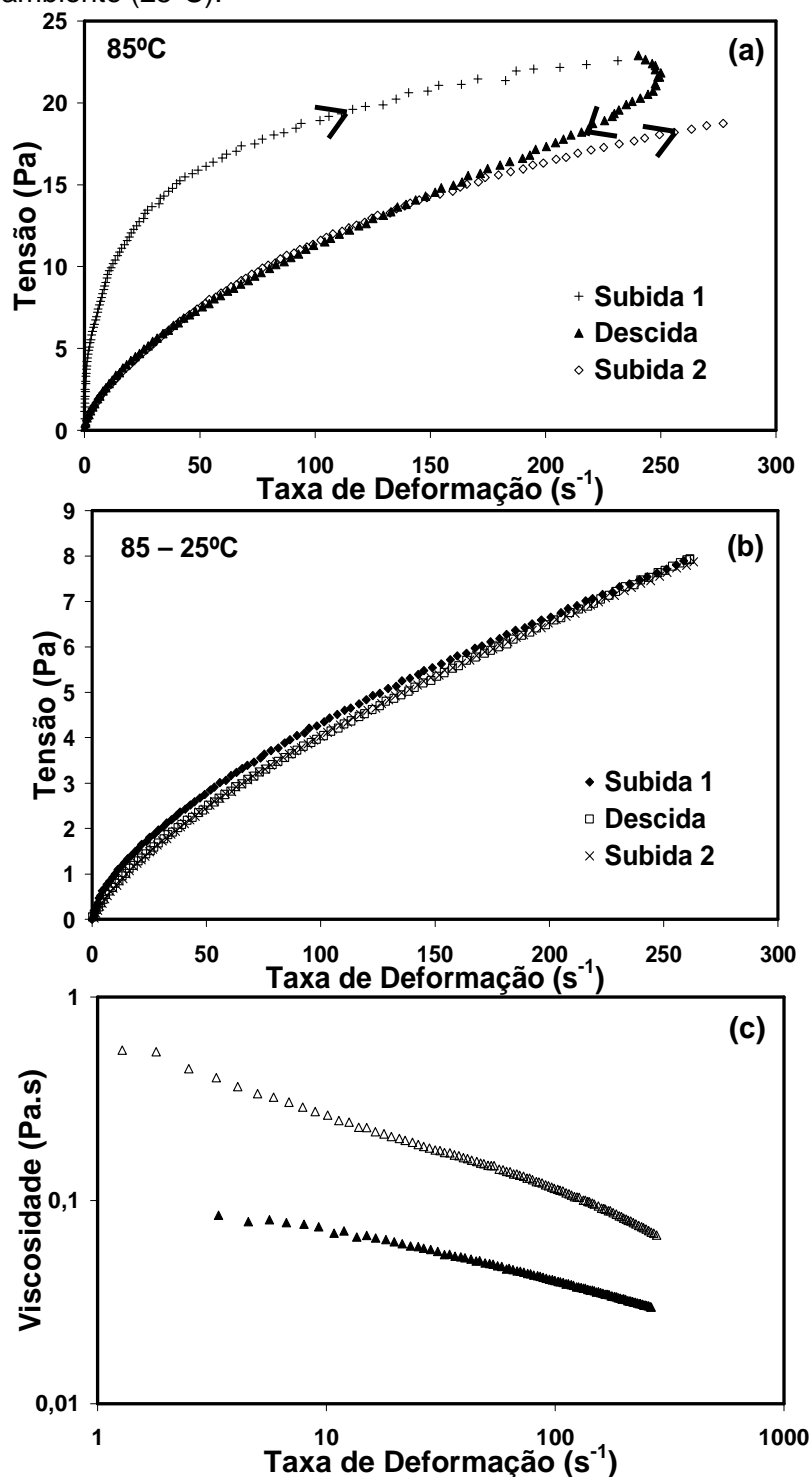


Figura A2. Curvas de escoamento (a, b) e viscosidade aparente (c) a 25°C dos extratos das sementes de linho extraídos a 85°C (a) e com choque inicial a 85°C e extraído à temperatura ambiente (25°C) (b). (△) 85°C e (▲) 85 – 25°C.

A partir das Figuras a e b, verifica-se que a extração a 85°C apresentou uma variação com o tempo de cisalhamento (rompimento estrutural), ou comportamento fortemente tixotrópico. Observa-se também, a existência de um comportamento de fluido pseudoplástico, visto que a viscosidade aparente diminuiu com o aumento da taxa de deformação aplicada, sendo a viscosidade da extração a 85°C superior à do extrato 85 – 25°C (Figura c). As curvas de escoamento foram ajustadas utilizando-se o modelo Lei da Potência (Equação 13) e os valores de viscosidade aparente a 100 s^{-1} foram calculados (Tabela A3).

Tabela A3. Efeito da temperatura de extração de FG no índice de consistência (k), índice de comportamento (n) e viscosidade (η_{100}) a 100 s^{-1} dos extratos obtidos.

	k (Pa.sⁿ)	n	η_{100} (Pa.s)
85°C	0,83	0,56	0,11
85 – 25°C	0,16	0,71	0,04

A partir da Tabela A3, pode-se observar que o índice de comportamento (n) foi maior para a extração com choque inicial a 85°C e extraído à temperatura ambiente (25°C), enquanto que o índice de consistência (k) e a viscosidade a 100 s^{-1} foram maiores para a extração a 85°C. Portanto, tem-se que o aumento na temperatura de extração de FG promoveu um aumento da viscosidade do extrato (aumento da resistência ao escoamento) e de sua pseudoplasticidade, o que também pôde ser observado na Figura A2. Pode-se dizer que com o aquecimento (85°C), os grupos reativos da cadeia de polissacarídeo se abrem formando ligações entre si, aumentando a viscosidade da solução, como resultado da formação de uma rede bastante estruturada (gel). Porém, com a aplicação da deformação, esta estrutura acaba rompendo, diminuindo a viscosidade (sol). Neste caso, o comportamento tixotrópico poderia ser descrito em termos da transição sol-gel.

Na extração a 85°C, obteve-se os maiores rendimentos, conforme observado na Tabela A2, porém verificou-se também um aumento na viscosidade do extrato (Figura A2). Portanto, visando maior rendimento de FG e facilitar o processo de extração, principalmente a etapa de peneiragem, onde a viscosidade influencia bastante, optou-se por estudar uma maior razão água:semente na temperatura de extração de 85°C.

1.3) Razão água:semente

Neste estudo, além da busca pela facilidade no processo de extração, tinha-se a preocupação em escolher uma condição que não apresentasse perda no rendimento. Para isso, avaliou-se a influência de três diferentes razões água:semente (13; 17,2 e 20) e os resultados estão apresentados na Tabela A4. Para o cálculo do rendimento de fibras solúveis em relação ao valor teórico, como já citado anteriormente, foi considerado que 8% de fibras solúveis estão presentes nas sementes de linho (Goh et al., 2006). A temperatura de extração utilizada foi 85°C (definida no item 1.2) e a razão etanol:extrato utilizada foi de 2:1 (definida no item 1.1).

Tabela A4. Rendimento de extração em diferentes razões água:semente.

Razão água:semente	Rendimento (%)		
	Fibras solúveis em relação ao valor teórico	FG em relação à massa seca semente	FG em relação à massa úmida semente
1:13	69,40	5,81	5,55
1:13	73,10	6,12	5,84
1:17,2	77,90	6,52	6,23
1:17,2	76,40	6,40	6,12
1:20	76,60	6,42	6,13
1:20	75,50	6,33	6,04

Analisando-se a Tabela A4, pode-se observar que os maiores rendimentos foram obtidos utilizando as razões de 17,2 e 20,0. Portanto, optou-se pela razão de 20,0, pois uma maior razão facilitaria na etapa de peneiragem, visto que o extrato obtido a 85°C é bastante viscoso (item 1.2). A partir do modelo gerado por Cui et al. (1994b) para a extração aquosa de FG, na temperatura de 85°C e pH 6,5-7,0, obtém-se um rendimento em torno de 7,2% para a razão água:semente de 17,2 e de 6,9% de FG em relação à massa de semente na razão de 20,0, resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

A partir destes ensaios preliminares, foram definidas as melhores condições de extração do polissacarídeo da linhaça (FG) das sementes de linho, sendo elas: razão de precipitação etanol:extrato (2:1), temperatura de extração de 85°C e razão água:semente de 20,0. Com isso, pode-se dizer que apenas os resultados da temperatura de extração reproduziram a condição otimizada por Cui et al. (1994b).

Assim, nas condições definidas, realizou-se a extração de FG das sementes de linho adquiridas no comércio local (Sabor da Terra Agro Indústria Ltda, Bragança Paulista, SP) para a realização de todos os ensaios descritos ao longo deste trabalho, sendo o rendimento final de extração de 95,45% de fibras solúveis em relação ao valor teórico, de 8,02% de FG em relação à massa seca de semente e de 7,64% de FG em relação à massa úmida de semente.